

TESIS CARRERA DE DOCTORADO EN FÍSICA

**CICLOS CIRCADIANOS: ESTRUCTURAS
EMERGENTES EN POBLACIONES DE OSCILADORES
ACOPLADOS.**

Guadalupe Cascallares
Doctorando

Dr. Pablo M. Gleiser
Director

Miembros del Jurado

Dr. Sergio A. Cannas (Universidad Nacional de Córdoba)
Dra. Inés Samengo (Instituto Balseiro)
Dr. Mauricio P. Sica (Instituto Balseiro)

Agosto de 2017

Física Estadística e Interdisciplinaria – Centro Atómico Bariloche

Instituto Balseiro
Universidad Nacional de Cuyo
Comisión Nacional de Energía Atómica
Argentina

A las moscas que perecieron en el proceso.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	v
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
1. Introducción	1
1.1. Ritmos biológicos	2
1.1.1. Relojes endógenos	4
1.2. Ritmos circadianos: algunas definiciones.	5
1.3. Organismos modelo.	6
1.3.1. Organismos modelo en cronobiología.	7
1.4. El reloj molecular	10
1.5. Mediciones en cronobiología	16
1.5.1. Actogramas	16
1.5.2. Curva de respuesta de fase	17
1.5.3. Periodograma	18
1.6. Objetivos de la tesis	19
2. Cianobacterias	21
2.1. Introducción	21
2.2. Reloj circadiano	22
2.3. Ventanja intrínseca vs extrínseca	23
2.4. El modelo	25
2.4.1. El oscilador circadiano	26
2.4.2. La modulación de las horas luz	27
2.5. Resultados	29
2.6. Conclusiones	32

3. Mamíferos	35
3.1. Introducción	35
3.2. Reloj circadiano en mamíferos	36
3.2.1. El reloj maestro	36
3.2.2. Los relojes periféricos	38
3.2.3. El reloj molecular	38
3.2.4. Acercamiento a datos experimentales	39
3.3. El fenómeno de sincronización	43
3.3.1. Perspectiva histórica	44
3.3.2. Algunas definiciones	44
3.3.3. El modelo de Kuramoto	45
3.3.4. Modelos de sincronización en mamíferos	48
3.4. El modelo	49
3.5. Resultados	51
3.6. Conclusiones	60
4. <i>Drosophila melanogaster</i>	63
4.1. La mosca de la fruta	63
4.2. Su relevancia circadiana	64
4.2.1. El reloj molecular en <i>Drosophila</i>	66
4.2.2. Redes neuronales	68
4.3. Desarrollo de un dispositivo de monitoreo de la actividad locomotora .	69
4.3.1. Configuraciones espaciales.	71
4.3.2. PySolo	72
4.4. Sujetos de estudio	74
4.4.1. Cría y mantenimiento de las moscas	74
4.4.2. Sistema GAL4/UAS	75
4.4.3. Líneas de <i>Drosophila</i> utilizadas	76
4.5. Actividad locomotora	77
4.5.1. Leyes de potencia	78
4.5.2. Resultados	79
4.6. Oviposición	94
4.6.1. Antecedentes	95
4.6.2. Protocolo del experimento	95
4.6.3. Periodograma de Lomb-Scargle	96
4.6.4. Resultados	97
4.6.5. Proyectos	102
4.7. Conclusiones	103

Índice de contenidos	vii
5. Conclusiones	105
A. Dispositivo d-Tracker	107
Bibliografía	113
Publicaciones asociadas	127
Agradecimientos	129

Índice de figuras

1.1. Caracterización de una función periódica.	3
1.2. Componentes del sistema circadiano y sus vías de interacción.	6
1.3. Crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	8
1.4. Actividad locomotora en <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.5. Reloj molecular básico.	11
1.6. Desfasaje entre los niveles de proteína y mRNA.	12
1.7. Reloj molecular en cianobacteria.	13
1.8. Reloj molecular simplificado de <i>Drosophila</i>	14
1.9. Reloj molecular simplificado de mamíferos.	15
1.10. Actogramas en double-plot.	16
1.11. Ejemplo de curva de respuesta de fase para un animal nocturno.	17
2.1. Fenotipos circadianos en cianobacteria.	24
2.2. Esquema del modelo teórico del oscilador circadiano en cianobacterias.	27
2.3. Duración del día durante 2012 para diferentes latitudes de Sudamérica.	28
2.4. Competencia entre distintas cepas.	30
2.5. Efecto de la modulación de la luz en la competencia entre cepas.	31
2.6. Crossover en la competencia debido a la modulación en la luz.	32
3.1. Núcleo supraquiasmático, reloj maestro en mamíferos.	37
3.2. Bioluminiscencia en rodajas del núcleo supraquiasmático de ratón.	40
3.3. Bioluminiscencia de PER2::LUC para uno de los canales ajustados.	41
3.4. Señal de bioluminiscencia de PER2::LUC para un canal sin oscilaciones.	42
3.5. Señal de bioluminiscencia de PER2::LUC para un canal no ajustado.	42
3.6. Períodos de cada oscilador ajustado antes y después del cambio de medio.	43
3.7. Instantáneas de la evolución temporal de las fases de 100 osciladores.	46
3.8. Frecuencias efectivas Ω en función de las frecuencias naturales ω	47
3.9. Parámetro de orden σ en función de la intensidad de acoplamiento k	48
3.10. Esquema del modelo teórico.	50
3.11. Sincronización de fase.	52
3.12. Parámetro de orden S como función del acoplamiento entre grupos.	53

3.13. S vs k para distintos σ_2	55
3.14. S vs k para distintos k_2	55
3.15. Ω vs ω	56
3.16. Evolución temporal de la fase.	57
3.17. Evolución de la fase de 10 osciladores en el cluster principal.	58
3.18. S vs k para distintos retardos.	59
3.19. Diagramas k_1 - k_2 para distintos retardos.	60
4.1. Estadios del ciclo vital de <i>Drosophila</i>	64
4.2. Dimorfismo sexual en <i>Drosophila</i>	64
4.3. Actogramas de los primeros mutantes reloj de <i>Drosophila</i>	65
4.4. El reloj molecular central en <i>Drosophila</i>	67
4.5. Ciclo adicional del reloj molecular de <i>Drosophila</i>	68
4.6. Red neuronal circadiana en la mosca	69
4.7. Pistas rectangulares.	72
4.8. Pistas circulares.	72
4.9. Máscaras del Pysolo-Video.	73
4.10. Trayectorias de ocho moscas en las pistas rectangulares.	74
4.11. Representación esquemática del sistema GAL4/UAS.	76
4.12. Actogramas para una mosca CS y <i>per</i> nula.	77
4.13. Ejemplo de un objeto fractal: el Triángulo de Sierpinski.	79
4.14. Ejemplo del análisis de las fluctuaciones en el movimiento de una mosca CS.	80
4.15. Histogramas de las fluctuaciones.	81
4.16. Discretización de la señal de distancias recorridas por segundo.	82
4.17. Distribución de la tasa de eventos de quietud y movimiento.	83
4.18. Ajuste de la distribución de intervalos de actividad para una mosca CS.	84
4.19. Intervalos de actividad y sueño para una mosca CS de día y noche.	85
4.20. Intervalos de actividad y sueño para una mosca <i>per</i> ⁰ de día y noche.	85
4.21. Los intervalos de actividad colapsan para los ratones.	86
4.22. Los intervalos de actividad colapsan también para las moscas.	87
4.23. Intervalos de actividad para las moscas CS en el caso de DD.	88
4.24. Cálculo de tiempos intereventos.	89
4.25. Distribución de tiempos de quietud e intereventos para las moscas CS.	89
4.26. Distribución de tiempos de quietud e intereventos para las moscas <i>per</i> nulas.	90
4.27. Distribución de la tasa de eventos para una mosca CS.	91
4.28. Colapso de la distribución de R para una mosca CS.	91
4.29. Colapso de la distribución de R para todas las moscas CS en LD.	92
4.30. Distribución de la tasa de eventos para una mosca <i>per</i> ⁰	93
4.31. Factor de Allan y Fano para moscas CS y <i>per</i> ⁰¹	94

4.32. Setup del experimento de oviposición.	96
4.33. Comportamiento de oviposición para una mosca en 6 días en LD.	98
4.34. El reloj molecular controla la oviposición.	99
4.35. La disminución de <i>per</i> en el cerebro genera arritmicidad.	100
4.36. Las neuronas LNV no controlan la ritmicidad en la puesta de huevos.	102
4.37. Ovipositor automático.	103
A.1. Esquema del d-Tracker.	107
A.2. Vista exterior del d-Tracker.	109
A.3. Vista del interior del d-Tracker.	110
A.4. Incubadora para realizar los experimentos de registro de actividad locomotora.	111

Índice de tablas

1.1. Los ritmos biológicos tienen distintos períodos.	4
4.1. Algunos de los principales mutantes de <i>Drosophila</i>	66
4.2. Ajustes de de los tiempos de quietud y actividad para las moscas CS. .	84
4.3. Los mutantes nulos de <i>per</i> y <i>tim</i> no tienen ritmos de oviposición	98
4.4. Importancia de <i>per</i> en el cerebro.	101
4.5. Se detectan ritmos de oviposición en las moscas <i>pdfG4 > per^{RNAi}</i>	101

Resumen

Todos los seres vivos, desde las bacterias a los humanos, tienen la capacidad de sincronizarse y anticiparse a los cambios periódicos impuestos por el ambiente, lo cual les otorga una ventaja evolutiva. Los ritmos circadianos, que son los ritmos cuyo período es cercano a la duración de un día, son generados por relojes a nivel molecular, que se sincronizan con el ambiente y se organizan para dar como resultado un comportamiento con ese período. En esta tesis estudiamos tres de los organismos modelos más estudiados en cronobiología: las cianobacterias, los ratones y la mosca de la fruta.

En cianobacterias analizamos el efecto de la modulación de la luz en la competencia entre cepas mutantes para el reloj. Utilizando un modelo teórico, se estudió el valor adaptativo del reloj. Propusimos un experimento sencillo para comprobar las predicciones del modelo.

Para estudiar el reloj de mamíferos también se utilizó un modelo matemático. Estudiamos la sincronización entre dos grupos de osciladores acoplados basados en la evidencia experimental de la existencia de dos grupos en el núcleo supraquiasmático, que es el reloj central de los mamíferos. Encontramos que en algunos casos el comportamiento global del sistema no es intuitivo y por ejemplo incrementar el acoplamiento entre ambos grupos puede ir en contra de una mayor sincronización global.

Por último, trabajamos en colaboración con la Dra Lorena Franco en la creación de su laboratorio de *Drosophila melanogaster*. Desarrollamos un dispositivo para hacer registro de la actividad locomotora de las moscas y realizamos experimentos con moscas wild-type y moscas mutantes en el reloj. Encontramos que las propiedades estadísticas de la actividad de la mosca son similares a las del ratón en el caso de las moscas wild-type. En el caso de las mutantes se evidencia en los patrones de movimiento que su reloj no funciona correctamente. Además, nos interesamos en un output menos estudiado, que es el comportamiento de oviposición. En primer lugar comprobamos que este ritmo también es circadiano. En búsqueda de cuál es la jerarquía de los relojes que controlan este ritmo, realizamos experimentos con distintos mutantes. Encontramos que las moscas con el reloj alterado en todos sus tejidos no presentan ritmicidad en la puesta de huevos y que las neuronas reloj son necesarias para mantener el ritmo.

Palabras clave: CICLOS CIRCADIARIOS, SINCRONIZACIÓN, REDES COMPLEJAS

Abstract

All living organisms, including animals, plants and many tiny bacteria, have the ability to synchronize and predict periodical environmental changes, which put organisms at a selective advantage in evolutionary terms. Circadian rhythms are those behavioral and physiological changes that follow a roughly 24-hour cycle, responding primarily to light and darkness. These rhythms are driven by a molecular clock. In this thesis, we will study circadian rhythms in three important model organisms: cyanobacteria, mice, and the fruit fly.

We analyzed the effect of having a modulation in the amount of light when two different strains of cyanobacteria grow in competition. Using a theoretical model, we studied the adaptative value of the clock. We have proposed a simple experiment, in order to verify our results.

We also used a mathematical model to study the mammalian clock. In mammals, the pacemaker neurons are located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the brain, which can be divided between a ventrolateral core and a dorsomedial shell region. We studied the synchronization properties of a system formed by two groups of fully coupled phase oscillators. Even for such a simple system, we show that counterintuitive behaviors can take place. In particular, we show that in some cases increasing the coupling between the oscillators can hinder global synchronization.

Finally, we have worked in collaboration with Dr. Lorena Franco, who is starting her *Drosophila*'s lab. We developed a tracking system to monitor the fly's locomotor activity, and performed experiments with wild-type and mutant flies. We found that several statistical properties of the locomotor activity are similar in mice and flies, and showed that the activity patterns in mutant flies are different from wild-type flies. We have also analyzed a poorly studied circadian rhythm, the egg-laying behavior. In the first place, we studied the molecular clock participation on egg-laying behavior by analyzing oviposition in control flies. Then we studied if oviposition is regulated by central or peripheral clocks and found that the central molecular clock is necessary for rhythmic oviposition.

Keywords: CIRCADIAN RHYTHMS, SYNCHRONIZATION, COMPLEX NETWORKS

Capítulo 1

Introducción

En toda la naturaleza existen comportamientos periódicos que son el resultado de la interacción entre distintos subsistemas. Los ritmos circadianos, es decir, los procesos que siguen el período de un día impuesto por la rotación terrestre, son un ejemplo de ello. Esta tesis abordará el estudio de los ciclos circadianos tanto desde lo teórico como desde lo experimental, haciendo uso de las herramientas de la física estadística.

La organización de la tesis refleja la evolución cronológica del trabajo. Si bien no es la evolución en complejidad de los organismos elegidos, si la es en cuanto a la variedad de herramientas utilizadas y aprendidas. En este capítulo, explicaremos los conceptos básicos necesarios para comprender los capítulos siguientes. En la segunda parte, que consta de los capítulos 2 y 3, utilizamos modelos matemáticos sencillos y simulaciones computacionales para estudiar distintos aspectos relacionados con los ritmos circadianos. En el capítulo 2 estudiaremos el efecto de la variación en la duración del ciclo de luz y oscuridad en la competencia entre distintas cepas reloj de cianobacterias. En el capítulo 3 presentaremos un modelo sencillo para estudiar la sincronización entre dos grupos de osciladores, semejantes a los grupos de osciladores que forman el reloj en mamíferos. También se comentarán los resultados obtenidos del análisis de datos experimentales de ratón durante una visita al laboratorio del Dr Hanspeter Herzog en el Instituto de Biología Teórica. Por último, en el capítulo 4 contaremos sobre el trabajo en colaboración con la Dra Lorena Franco en la formación de su laboratorio de *Drosophila*. Este capítulo se divide en el estudio de dos ritmos circadianos diferentes, la actividad locomotora y la oviposición. Para realizar los experimentos de actividad locomotora se construyó un dispositivo de monitoreo y se analizaron los datos obtenidos, comparándolos con otros organismos modelo. También describiremos los experimentos realizados con las moscas midiendo la puesta de huevos de hembras en forma individual junto a los resultados obtenidos.

1.1. Ritmos biológicos

A la Tierra le toma 365 y $1/4$ días completar una revolución alrededor del Sol, y a ese tiempo le llamamos año. En el primer día del invierno, entre el 20 y el 23 de junio en nuestro hemisferio, el Sol se encuentra a la mayor distancia angular negativa del ecuador celeste. Esto implica que en los siguientes meses las noches se irán acortando y los días serán más largos, dando lentamente la bienvenida a la primavera. Durante miles de años las distintas culturas que habitaron el planeta, desde los griegos en occidente a los chinos en oriente, celebraron este día, dándose cuenta de la periodicidad del ciclo de luz-oscuridad, de las estaciones y de las mareas.

Dentro del hemisferio sur, los pueblos originarios quechua, aymara y mapuche, que tienen una economía agraria, celebran el año nuevo indicado por el solsticio de invierno como una época de renovación y purificación. Este fenómeno marca la finalización del período de cosecha y el principio de una nueva época de siembra. Para los incas, el *Inti Raymi* (o fiesta del sol) es la celebración mediante ritos y sacrificios de un período en el cual la tierra descansa y se prepara para una nueva siembra.

Los sacrificios debían hacerse para no tener que alimentar a los animales durante el invierno, lo que daba la oportunidad de comer carne fresca. Las bebidas estaban fermentadas y todo se conjugaba para dar por finalizada la noche más larga y celebrar el poder de la luz y la vida sobre la oscuridad y la muerte. De esta forma y hasta nuestros días ha llegado una organización del tiempo festivo por causas que fueron claras y evidentes en su origen. Gracias a la predictividad y regularidad de los ciclos solares y lunares se estructuraron las actividades rituales. En otras palabras, nuestros ancestros notaron la ritmicidad de su entorno, y tomaron ventaja de ello para su evolución como sociedad.

La interacción de la Tierra con el Sol y la Luna da lugar a variaciones ambientales periódicas como las horas diarias de luz y oscuridad, las estaciones o las mareas. La influencia predecible del medio ambiente sobre todos los seres vivos les dio la posibilidad de adaptarse para responder con variaciones comportamentales y fisiológicas que se ajustan a la frecuencia de los ciclos externos. Aquellos que adquirieron la capacidad de anticiparse y sincronizarse con el medio obtuvieron una ventaja evolutiva, y con ella, el éxito y supervivencia.

A los fenómenos biológicos que ocurren en intervalos regulares de tiempo se los denomina ritmos biológicos [1]. La disciplina que estudia estos ritmos en las funciones corporales es la cronobiología (de *chronos*, tiempo en griego), y vale destacar que nada tienen que ver con los biorritmos propuestos por el médico austriaco Wilhelm Fleiss, en los que se intenta predecir la vida de un individuo basándose en cuando nació. Los biorritmos son una pseudociencia basada en la numerología, que carece de pruebas científicas sólidas.

Las funciones rítmicas están bien definidas matemáticamente, y expresan la repetición de una variable cada determinado intervalo de tiempo. Así, podemos dejar definidos los conceptos que caracterizan el ritmo: amplitud (A), período (τ) y fase (ϕ). La amplitud es la mitad de la distancia entre el valor más alto y más bajo del ciclo. El período es el tiempo que tarda la función en completar un ciclo, y su inversa, la frecuencia, es el número de veces que se repite un evento en una unidad de tiempo. La fase es un punto específico en el ciclo, es decir, nos dice en que momento de la escala temporal está ubicado el ritmo. En general, la fase está referida a otra función periódica que puede ser externa (hora del día, etc.) o bien interna (otro ritmo biológico). Para caracterizar la fase se utiliza el momento en el que ocurre el pico máximo de la variable rítmica, tiempo denominado “acrofase” (Figura 1.1).

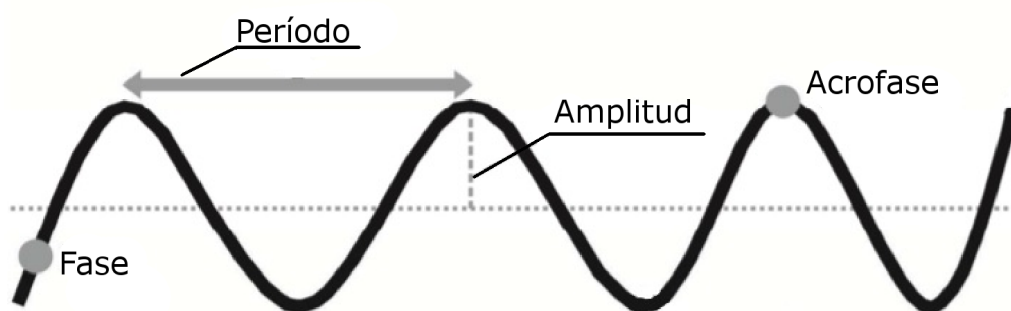


Figura 1.1: Caracterización de una función periódica. El período, la amplitud y la fase son los tres componentes que caracterizan a una onda. También se marca la acrofase en la figura, que corresponde a la fase en el máximo de la función.

Los ritmos biológicos se clasifican según su período. El ciclo de luz-oscuridad es probablemente uno de los de mayor influencia en la evolución, ya que dividió a las especies entre aquellas de actividad diurna o nocturna, generando diferencias temporales en los comportamientos de las especies que permiten la coexistencia en el mismo hábitat. Los ritmos que se repiten con un período cercano a un día se los llama circadianos. Pero también los hay con período menor a un día (ritmos ultradianos), como la respiración, y con período mayor (ritmos infradianos), como la migración e hibernación, asociados a las estaciones (Tabla 1.1).

Tipo de ritmo	Período	Ejemplo
Ultradianos	0.1 s	Electroencefalograma
	1 s	Ritmo cardíaco
	6 s	Respiración
Circadiano	24 h	Sueño-Vigilia
		Temperatura corporal
Circamensual	28 d	Ciclo ovulatorio
Circanual	365 d	Hibernación
		Migración

Tabla 1.1: Los ritmos biológicos tienen distintos períodos. Se presentan algunos ejemplos de ritmos con períodos que van desde las décimas de segundo al año.

1.1.1. Relojes endógenos

Si bien las primeras observaciones registradas de ciclos circadianos datan de 500 A.C., la primera evidencia de que los ritmos circadianos son generados por un sistema endógeno fue presentada en 1729 por el astrónomo francés Jean-Jacques de Mairan, quien estudió el movimiento de las hojas de la planta *Mimosa pudica* [2]. Él observó que la planta extendía sus hojas durante el día y las retraía durante la noche. Para determinar si este movimiento era una mera respuesta a la luz solar, en el primer experimento cronobiológico conocido, metió una planta en un armario, aislándola del ciclo de luz-oscuridad. De esta forma comprobó que los movimientos rítmicos de las hojas continuaban realizando un ciclo cercano a 24 horas, sugiriendo un mecanismo endógeno que controla el movimiento de las hojas aún en ausencia de estímulos externos. La conclusión de de Mairan fue que existía un “reloj interior” que regulaba la conducta de la planta.

Una amplia evidencia experimental del origen endógeno de los ritmos fue extendiéndose más allá de los primeros estudios en plantas hacia una gran variedad de especies como bacterias [3], insectos [4], pájaros [5], roedores [6], primates [7] y humanos

[8]. Para comprobar que el ritmo es endógeno, siguiendo la metodología implementada por de Mairan, se realizan experimentos donde se aísla a la especie estudiada y se la coloca en condiciones ambientales constantes para ver si persiste el ritmo. Al período del ritmo en ausencia de señales ambientales para sincronizarse, se lo conoce como *free-running*, y puede ser un poco mayor o menor a 24 horas dependiendo la especie.

1.2. Ritmos circadianos: algunas definiciones.

Los ritmos circadianos se definen como aquellos cuyo período *free-running* está entre 20 y 28 horas. El término circadiano fue utilizado por primera vez por el cronobiólogo Franz Halberg en los '60, y viene del latín *circa*, “alrededor” y *diem* “día”. Las propiedades que deben poseer los relojes circadianos fueron resumidas por Colin Pittendrigh [9]:

- Son endógenos y tienen oscilaciones auto-sostenidas, ya que al aislarlos del medio ambiente se mantienen con un período cercano a 24 horas.
- Se sincronizan con los cambios cíclicos del ambiente, como el ciclo de luz-oscuridad. A la clave exógena que sincroniza al ciclo con el ambiente se la conoce como *zeitgeber*, en alemán “dador de tiempo”. El *zeitgeber* más efectivo es la luz, pero también funcionan otros como la temperatura, las interacciones sociales o la disponibilidad de alimento.
- Presentan compensación térmica, es decir, el período es estable ante cambios de temperatura dentro del rango fisiológico.

De manera conceptual, al sistema o reloj circadiano lo podemos pensar como la conjunción de tres elementos: un sincronizador exógeno o *zeitgeber*, un oscilador central o *pacemaker* y una eferencia del reloj o *output*. En un ejemplo clásico, la luz sincroniza al reloj central para dar como resultado el ciclo de sueño-vigilia. Los procesos de conexión que tienen estos tres componentes son la sincronización que induce el *zeitgeber* entre el medio ambiente y el oscilador central, quien a su vez está acoplado con los ritmos que controla.

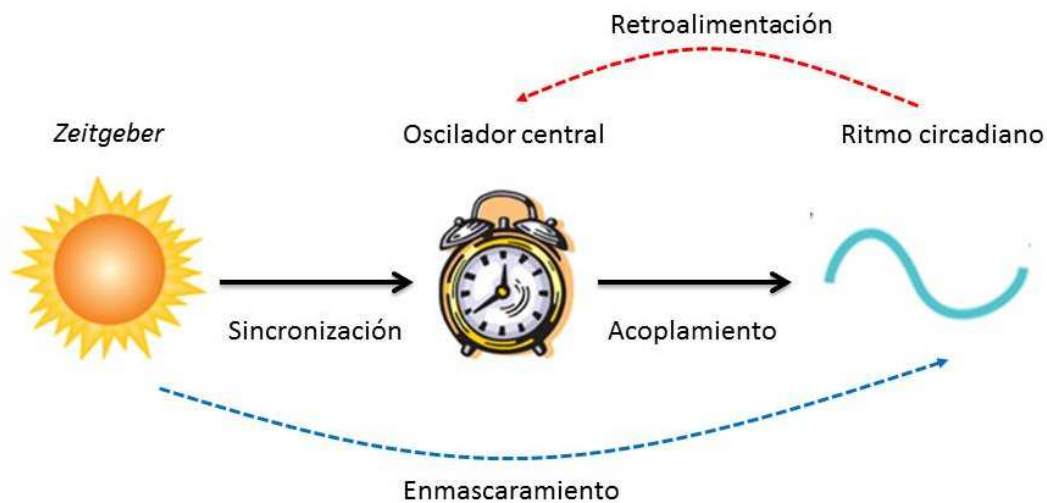


Figura 1.2: Componentes del sistema circadiano y sus vías de interacción. El *zeitgeber* sincroniza al oscilador central del organismo, quien acopla a todos los osciladores y dan como resultado distintos *outputs* con período cercano a 24 horas. Figura modificada de [10], pág. 1164.

La información temporal brindada por el oscilador central a las eferencias regula la generación de procesos metabólicos y comportamentales. Además, en algunos relojes circadianos más complejos, aparecen otros mecanismos de regulación del sistema como la retroalimentación de los efectores al oscilador central y el enmascaramiento, que es la influencia del sincronizador directamente sobre los efectores del ritmo [1].

1.3. Organismos modelo.

En nuestro planeta habitan infinidad de especies diferentes en formas y complejidad, pero muchas comparten los mismos principios generales en sus procesos biológicos. Es por esto que las investigaciones de varias disciplinas, como la genética, la evolución y el desarrollo, han centrado sus esfuerzos en unos pocos animales elegidos debido a que gracias a su tamaño y su rápida reproducción facilitan su manipulación experimental [11]. Los organismos modelo pueden ser encontrados entre los distintos reinos, desde procariotas a plantas y animales. Así, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus* son ejemplos de organismos sometidos a un profundo estudio, para los cuales se han desarrollado distintas técnicas genéticas que permiten su manipulación.

Uno de los aspectos más interesantes del uso de organismos modelo es que el conocimiento de un proceso en un organismo puede ayudar a comprender un proceso similar en otro organismo más complejo. Un caso paradigmático es la identificación de genes en *Drosophila* que llevaron al descubrimiento de genes homólogos en mamíferos. Por ejemplo, las personas que sufren de síndrome de la fase de sueño avanzada (FASPS,

por sus siglas en inglés) tienen un avance en la fase de su ciclo de sueño-vigilia y un período endógeno más corto que el normal. Este síndrome se descubrió luego de hallar genes en la mosca relacionados a los ciclos circadianos, que causaban este mismo efecto [12].

1.3.1. Organismos modelo en cronobiología.

Como ya mencionamos, los ritmos circadianos pueden ser encontrados en casi todos los organismos que se enfrentan diariamente a los cambios ambientales. Para comprender los mecanismos subyacentes al reloj circadiano y su importancia adaptativa, se lo ha estudiado en bacterias, hongos, plantas y animales. En los párrafos siguientes haremos un resumen del reloj de un organismo representativo de cada reino, yendo de menor a mayor complejidad.

Las cianobacterias son los microorganismos que crearon la atmósfera de oxígeno del planeta y posibilitaron la vida tal y como la entendemos actualmente. Los primeros ritmos encontrados en cepas de cianobacterias fueron oscilaciones durante la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, aunque inicialmente no estaban asociados al reloj circadiano [13]. No fue hasta 1986 que Huang *et al* [14, 15] demostraron que la fijación de nitrógeno en *Synechococcus* sp. RF-1 satisface las tres propiedades de los ritmos circadianos: persistencia ante condiciones ambientales constantes, reseteo de la fase y compensación térmica. Este es el único organismo procariota del que se conoce un reloj circadiano completo. Una de las cepas de cianobacteria más utilizadas como organismo modelo es *Synechococcus elongatus*, cuya manipulación es simple. El desarrollo de varias herramientas genéticas para esta cepa ha permitido el estudio de los relojes circadianos en procariotas. Aunque el reloj de las cianobacterias es más simple que otros conocidos, aún quedan muchos elementos por descubrir para comprender sus mecanismos [13].

Neurospora crassa, el moho rojo del pan, fue uno de los primeros microbios eucariotas en ser adoptado como modelo. Su rápido crecimiento, su sencillo mantenimiento en el laboratorio y la secuenciación de su genoma completo [16] lo convirtieron en un organismo modelo. En cronobiología, su utilidad se debe al sencillo registro de su *output* circadiano: durante su desarrollo asexual produce esporas conocidas como conidias con intervalos cercanos a las 24 horas. Estos ritmos fueron reportados por primera vez en 1959 por Colin Pittendrigh [17]. En condiciones ambientales constantes tiene un período de $\approx 22,5$ horas, aunque puede ser entrenado a un ciclo de 24 horas y presenta compensación térmica. El hallazgo del alelo *band*, que permite una clara visualización de la formación de esporas (Figura 1.3), se convirtió en una herramienta clave para el estudio de ritmos circadianos en *Neurospora* [18].



Figura 1.3: Crecimiento de *Neurospora crassa*. Plato de Petri con *Neurospora* inoculada en el centro con agar como medio de crecimiento. Las bandas correspondientes al crecimiento de esporas de cada día pueden observarse en amarillo, separadas por delgadas líneas oscuras. Imagen tomada de <http://lakinthomas.lab.yorku.ca>

Desde las primeras observaciones de de Mairan, se sabe que el movimiento de las hojas de la planta *Mimosa* está controlado por el reloj biológico. Actualmente, el organismo modelo en biología vegetal es la planta *Arabidopsis thaliana*, donde se han encontrado diversos procesos regulados por el reloj circadiano, desde la apertura de estomas y movimiento de hojas hasta la expresión génica y fosforilación de proteínas [19]. Aunque ya se han identificado más de 25 genes asociados al funcionamiento del reloj de *Arabidopsis*, las funciones de muchos de estos genes aún son desconocidas [20].

Hace ya 100 años que Thomas Hunt Morgan convirtió a *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*, amante del rocío, *melanogaster*, de vientre negro) en el principal organismo modelo de la genética clásica al elegirla como modelo para sus experimentos sobre herencia. En 1910 descubrió al primer mutante, *white eye*, que es una mosca que a diferencia de las wild-type, que tienen los ojos rojos, los tiene blancos, como su nombre lo indica. Este trabajo le valió el premio Nobel. Morgan eligió a *Drosophila* por su corto ciclo vital, su alta fecundidad y su sencilla manipulación. *Drosophila* presenta muchos ritmos circadianos fácilmente medibles en el laboratorio. Aunque inicialmente se midió el ritmo en la eclosión, actualmente el más utilizado es la actividad locomotora (Figura 1.4), que persiste ante condiciones constantes por varias semanas. La mosca presenta dos picos de actividad, uno al amanecer y otro al atardecer, con una siesta en el medio. Se observa que la mosca tiene la capacidad de anticipar los cambios en el ciclo externo, por lo que comienza a tener actividad antes de que se produzca el cambio de iluminación. Además, al prenderse o apagarse la luz, incrementa su actividad como respuesta al cambio.

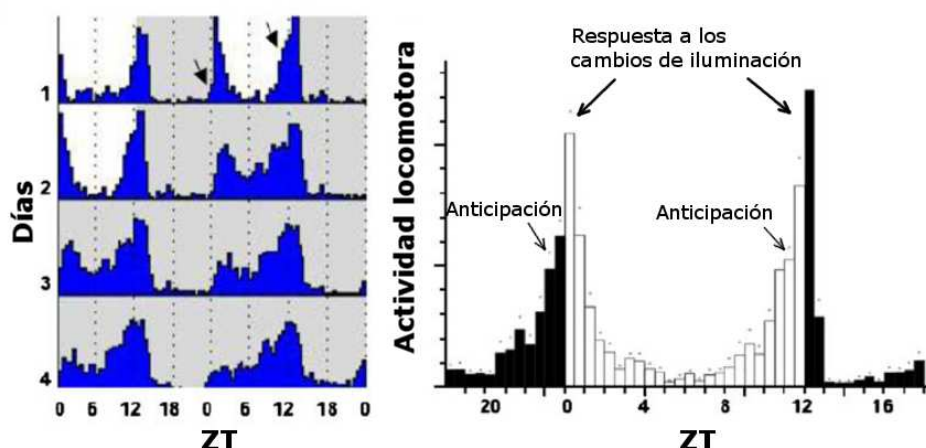


Figura 1.4: Actividad locomotora en *Drosophila melanogaster*. A la izquierda se grafica la actividad de una mosca durante cuatro días en un double-plot, es decir, cada día se repite al final de una fila y al principio de la siguiente. A la derecha se puede observar una ampliación del día 1, lo que permite ver marcado con flechas la anticipación al cambio en la iluminación. Las barras blancas y negras representan los períodos de luz y oscuridad respectivamente. ZT es el tiempo impuesto en el sistema por la variable rítmica ambiental. Por convención, cuando el *Zeitgeber* es la luz por ejemplo, ZT0=‘luces prendidas’ y ZT12=‘luces apagadas’ en un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Figura modificada de [21].

Otro factor que convirtió a *Drosophila* en un organismo modelo muy importante de los ritmos circadianos es la homología que se encontró entre invertebrados y mamíferos en su control. El estudio a nivel circadiano de las moscas es un excelente ejemplo de cómo los organismos modelo pueden facilitar el estudio de mecanismos moleculares que dan lugar a comportamientos complejos, como los ritmos de sueño/vigilia en humanos [22]. Además, su red neuronal es simple. Se conocen alrededor de 150 neuronas reloj en el cerebro de la mosca de un total de alrededor de 250.000 neuronas, lo cual permite identificar la función de distintos subgrupos de neuronas [23]. Actualmente se está haciendo un gran esfuerzo e invirtiendo muchos recursos para obtener el conectoma de *Drosophila*, es decir, el mapa de las conexiones entre las neuronas del cerebro. Laboratorios como Janelia ya han conseguido tener partes completas del conectoma descifradas, particularmente las del sistema visual [24].

Por último, uno de los organismos modelo más importantes para estudiar el reloj es el ratón (*Mus musculus*), debido a las similitudes de su reloj con el del humano. Sin embargo, en la historia de la cronobiología, el primer roedor en tener un lugar importante fue el hámster *Mesocricetus auratus*. En 1985 Michael Ralph identificó un hámster que al pasarlo a oscuridad constante (DD, del alemán Dauer-Dunkel, que significa permanentemente oscuro) exhibía un período endógeno de 22 horas, el más corto reportado en esta especie. Esta mutación espontánea, denominada *tau*, resultó ser tal que su fenotipo es heredable [25]. A partir del hámster *tau* se encontró que el reloj maestro de los mamíferos se encuentra en el núcleo supraquiasmático (NSQ). Al lesionar esta zona del hipotálamo, los animales se volvían arrítmicos. Pero aún más interesante,

si se le transplantaba un NSQ intacto, la ritmicidad era recuperada y se manifestaba el fenotipo del donante [26]. Desde el punto de vista de la genética habría sido interesante que esta mutación casual se hubiera dado en el ratón y no en el hámster, ya que en ese entonces había muchas más herramientas genéticas desarrolladas [27].

El primer gen reloj identificado en ratones fue *Clock*, descubierto a través de un ensayo de búsqueda por mutagénesis [28]. Las ventajas de *Mus musculus* por sobre el hámster son el genoma completamente secuenciado y la posibilidad de poder realizar genética reversa, características que hacen del ratón no sólo un organismo modelo en cronobiología, sino también en otras áreas de investigación.

En esta tesis estudiaremos con distinto grado de detalle los relojes de tres de los organismos descriptos: cianobacteria, ratones y *Drosophila*. Abordamos el estudio de los ritmos circadianos con diferentes niveles de complejidad, analizando desde las ventajas que otorga el reloj a nivel poblacional en el caso de las cianobacterias a considerar los mecanismos moleculares en *Drosophila*.

1.4. El reloj molecular

Los ritmos circadianos están determinados genéticamente por un conjunto de genes denominados “genes reloj”. Los genes reloj codifican proteínas que tienen expresión cíclica y son necesarias para la generación y mantenimiento de los ritmos. Los experimentos de Konopka y Benzer en 1968 mostraron por primera vez que el comportamiento rítmico podría tener una base genética [29]. Konopka logro aislar tres alelos de un único gen (denominado *period* o *per*) de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* que aceleraba, frenaba o paraba al reloj circadiano.

La base molecular de los relojes tiene elementos comunes en todas las especies estudiadas hasta el momento [30]. El mecanismo molecular básico del reloj consiste en un ciclo de retroalimentación negativa. Los componentes positivos del ciclo inician la transcripción de los genes reloj, generando secuencias de ARNm en el núcleo que son transportadas al citoplasma, dando lugar a la traducción de proteínas, que al acumularse, reprimen su propia síntesis (Figura 1.5).

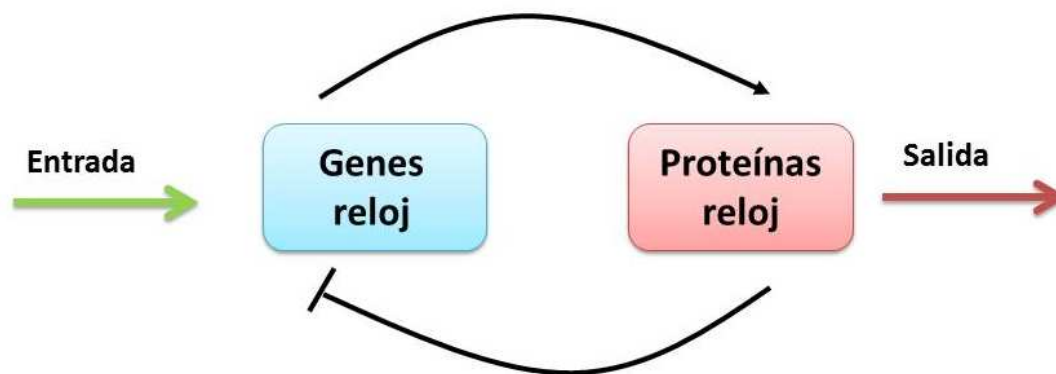


Figura 1.5: Reloj molecular básico. Componentes del reloj basado en un ciclo de retroalimentación negativa. La flecha normal indica que se promueve la transcripción, mientras que la flecha plana indica represión. Así, las proteínas reloj reprimen su propia síntesis.

De esta forma se genera un ciclo autoregulatorio de oscilaciones a nivel genético con un período cercano a las 24 hs [30, 31]. En la Figura 1.6 se muestra un ejemplo de las oscilaciones en las proteínas y en los niveles de sus mRNA para algunos genes reloj de la mosca. Se observa que hay un delay entre los picos de ambos, debido a procesos postraduccionales, como la fosforilación y la ubiquitinación. La fosforilación es la unión de proteínas con grupos fosfatos, que puede hacer que se impida la interacción de una proteína con alguna otra. La ubiquitinación es la unión de proteínas con una molécula de ubiquitina, que es una proteína pequeña de 76 aminoácidos. El proceso de ubiquitinación es esencial en numerosos procesos como el acortamiento y degradación de proteínas. Estos procesos son fundamentales para mantener el período de las oscilaciones cercano a 24 horas.

En los próximos párrafos nos vamos a centrar en el reloj molecular simplificado de los tres organismos modelos relevantes para este trabajo: cianobacterias, la mosca *Drosophila melanogaster* y el ratón. Para evitar confusiones usamos la convención en biología, según la cual los genes se denotan con letras minúsculas (por ejemplo, *per*), los ARNm comienzan con mayúscula (*Per*) y las proteínas y complejos proteicos se escriben sólo con mayúscula (*PER*).

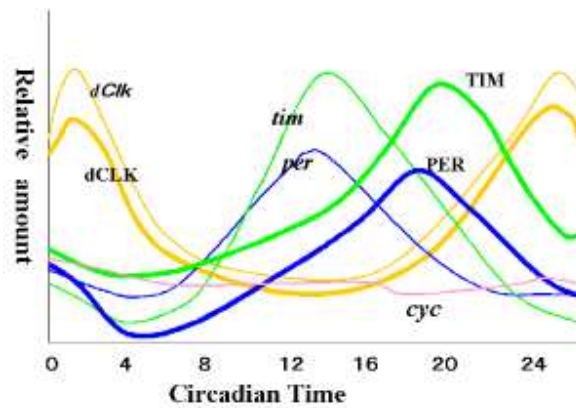


Figura 1.6: Desfasaje entre los niveles de proteína y mRNA. Expresión de cuatro genes reloj y de sus respectivas proteínas. Se puede observar, en el caso de *per* y *tim*, los dos genes reloj principales de la mosca, que el pico en la expresión de proteína, que es por la noche, no coincide con el de su mRNA, que es por la tarde.

Los mecanismos del reloj molecular en mamíferos y en *Drosophila* están conservados. Como ya mencionamos, en ambos el oscilador circadiano involucra la transcripción y traducción cíclica de los genes reloj mediante ciclos de retroalimentación negativa [32]. A diferencia de éstos, el mecanismo principal del reloj en cianobacterias consiste en un oscilador postraslacional (OPT) conectado con un ciclo transcripcional de retroalimentación negativa (CTR) [33].

Los componentes básicos del reloj en *Synechococcus elongatus* fueron identificados como las proteínas KaiA, KaiB y KaiC [34]. En ese momento, parecía que el mecanismo era un ciclo transcripcional de retroalimentación negativa. La expresión del complejo KaiBC es regulada en forma positiva por KaiA y tanto positiva como negativa por KaiC, dependiendo de su estado de fosforilación. Este ciclo hace que los genes reloj oscilen en forma circadiana. Pero en 2005 los experimentos de Nakajima *et al* [35] mostraron que el estado de fosforilación de KaiC continua ciclando cuando las tres proteínas son mezcladas en un tubo de ensayo con ATP. Este ritmo persiste con período circadiano y tiene compensación térmica. In vivo, este oscilador de tres proteínas funciona como un oscilador postraslacional [35, 36]. Finalmente, Kitayama *et al* sugirieron que ambos osciladores son necesarios para la coordinación del reloj [37]. En la Figura 1.7 se muestra el esquema del funcionamiento a nivel molecular del reloj de cianobacterias.

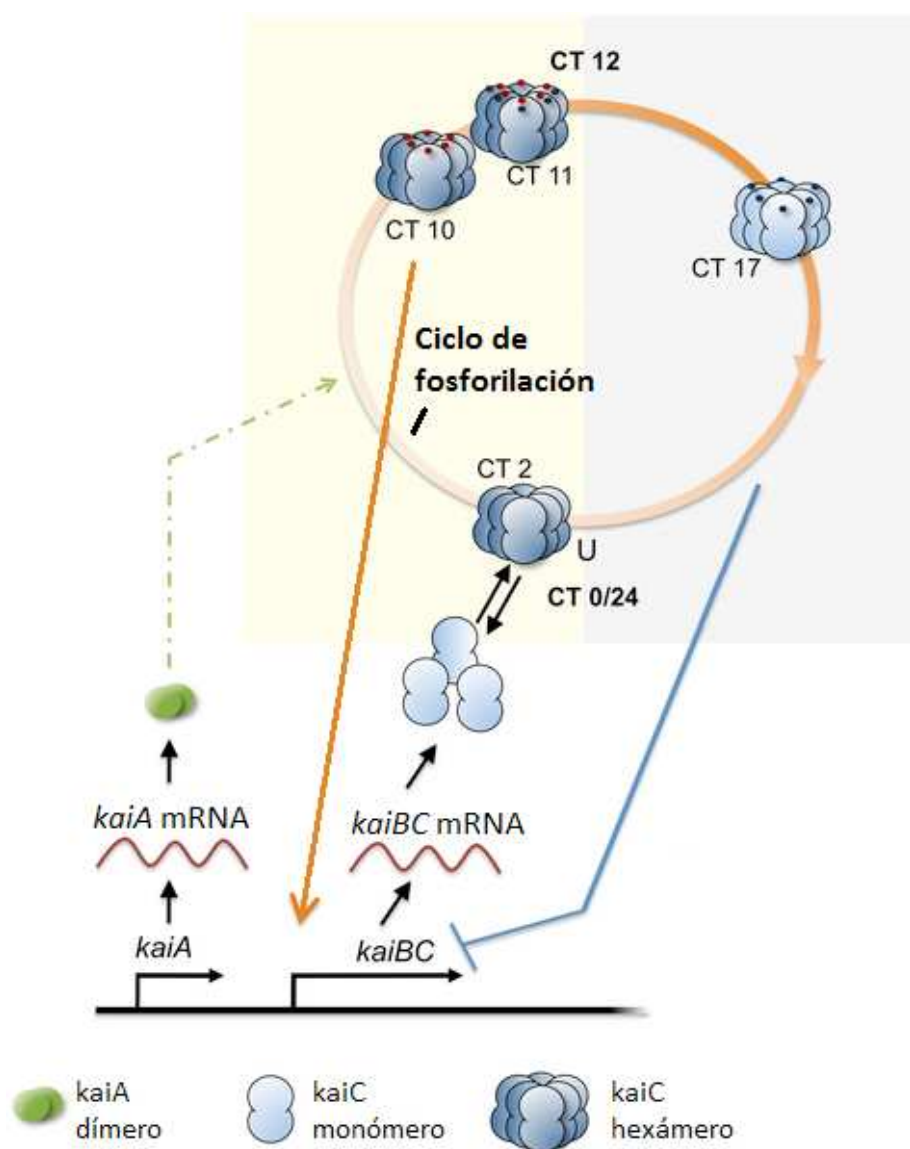


Figura 1.7: Reloj molecular en cianobacteria. A diferencia de otros organismos, un oscilador postraslacional es el reloj maestro, quien se acopla con un ciclo de transcripcional de retroalimentación negativa. El ciclo de fosforilación de *kaiC* forma el mecanismo principal del reloj. Figura modificada de [38].

El reloj circadiano en *Drosophila melanogaster* está formado por dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa, como se muestra en la Figura 1.8. En el primer circuito, el dímero CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) activa la transcripción de los genes *period* (*per*) y *timeless* (*tim*). PER y TIM dimerizan y se trasladan al núcleo hacia la medianoche, donde se unen a CLK/CYC, inhibiendo su unión al ADN y la activación de la transcripción. Aunque el pico máximo en la transcripción de *per* y *tim* es alrededor de ZT16, las respectivas proteínas alcanzan su pico 6 horas después [39]. Este retraso temporal se debe a las fosforilaciones que sufren PER y TIM. PER es fosforilado por DOUBLETIME (DBT), mientras que TIM es fosforilado por SHAGGY (SGG). Los procesos de fosforilación y desfosforilación son fundamentales para mantener el

fenotipo circadiano [40]. En particular, la fosforilación por parte de SGG está involucrada en la estabilización de TIM [41] y en la traslocación al núcleo de PER y TIM [42].

En un segundo loop, CLK/CYC activa la transcripción de PDP1 ϵ (*Par Domain Protein 1 ϵ*) y VRI (*vrille*). Sus funciones son opuestas: VRI inhibe la transcripción de *clk*, mientras que PDP1 ϵ la estimula. Este segundo ciclo se entrelaza con el de PER/TIM, dando más estabilidad al sistema [40]. La función de este segundo ciclo aún no es clara, ya que alterar la fase de *clk* tiene sólo un pequeño efecto en la fase o el período del comportamiento [43, 44].

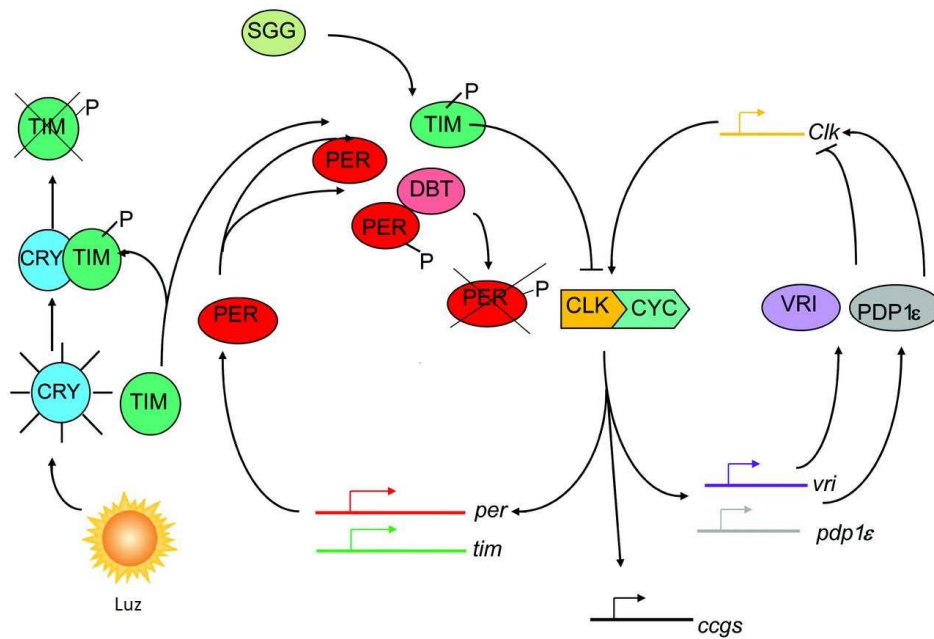


Figura 1.8: Reloj molecular simplificado de *Drosophila*. PER y TIM reprimen su expresión mediante CLK y CYC, que al dimerizarse activan la transcripción de *per* y *tim*. Clk es regulado en forma negativa por VRI y positiva por PDP1 ϵ , quien a su vez es regulado positivamente por CLK–CYC y negativamente por PER–TIM. De esta forma es CLK quien interconecta los dos ciclos, estabilizando el ciclo circadiano. Figura modificada de [39].

Para sincronizarse con el ciclo ambiental, *Drosophila* utiliza el fotoreceptor de luz azul CRYPTOCHROME (CRY) [21]. La luz activa a CRY, que al unirse a TIM comienza su degradación. Durante el principio de la noche, que es cuando comienza la acumulación de TIM, un pulso de luz lleva a un retardo en esta acumulación, lo cual explica porque un pulso de luz genera retardos en la fase del ritmo. En cambio, si el pulso de luz es hacia el final de la noche, se acelera el proceso de degradación de TIM, lo que induce a un adelantamiento en la fase del ritmo.

Por último, el reloj de los mamíferos, al igual que el de *Drosophila*, está formado por dos ciclos de transcripción con retroalimentación negativa, como se muestra en la Figura 1.9. Como ya mencionamos, un aspecto saliente es que varios de los genes reloj de la mosca tienen sus homólogos en mamíferos, incluidos los humanos. En el caso del

síndrome FASPS, las responsables son mutaciones en los genes *per2* y *ck1δ*, homólogos de *per* y *dbt* respectivamente [12, 45].

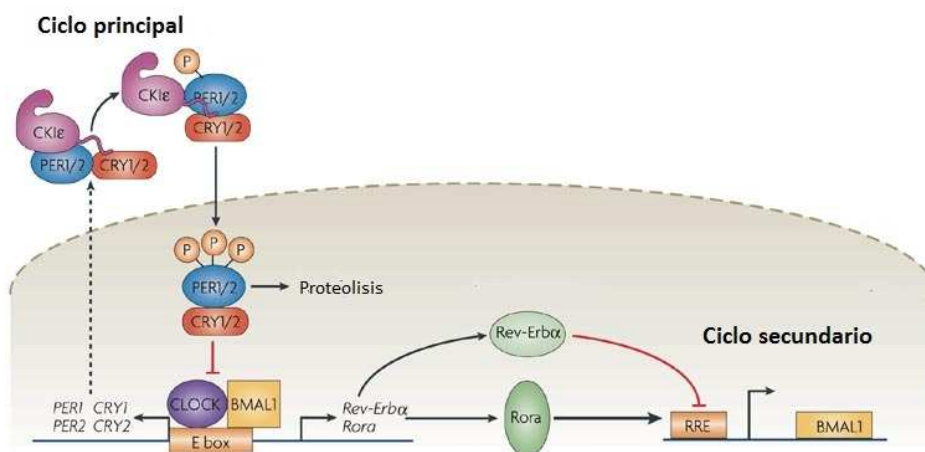


Figura 1.9: Reloj molecular simplificado de mamíferos. CLOCK y BMAL1 promueven la expresión de las proteínas period PER1 y PER2 y los criptocromos CRY1 y CRY2. A lo largo del día, PER y CRY se acumulan y dimerizan en el citoplasma, donde son fosforiladas por caseínas quinasas. Luego translocan al núcleo donde interactuando con el complejo CLOCK/BMAL1 reprimen su propio activador. Al final del ciclo, PER y CRY se degradan por proteólisis, permitiendo comenzar un nuevo ciclo. Un ciclo secundario formado por el activador Ror y el inhibidor Rev-ERB controla la expresión de BMAL1. Figura modificada de [40].

En el primer ciclo de los mamíferos, los elementos positivos son CLOCK y BMAL1 (del inglés Brain and Muscle ARNT-Like protein), que es el homólogo de CYC. El heterodímero formado por CLOCK y BMAL1 se une a una región del ADN llamada E-box, que es una secuencia nucleotídica de 6 bases (CACGTG) ubicada en la región reguladora de los genes relacionados con el reloj circadiano, activando el proceso de transcripción. Luego, la transcripción de los genes *per* y *cry* es promovida. Las proteínas PER1, PER2, CRY1 y CRY2 funcionan como elementos negativos del reloj. PER y CRY se unen formando heterodímeros que ingresan al núcleo y regulan negativamente su propia transcripción inhibiendo al complejo CLOCK-BMAL1. La degradación de PER y CRY es inducida por la fosforilación por parte de las caseínas quinasas CK1δ y CK1ε, con lo que se deja de inhibir a CLOCK-BMAL1 y el ciclo vuelve a comenzar. A diferencia de *Drosophila*, las propiedades de CRY como fotoreceptor aún no han sido demostradas [46].

El segundo mecanismo regula la expresión de *Bmal1*. El heterodímero CLOCK-BMAL1 ingresa al núcleo y activa la transcripción del gen *Rev-erba* y *RORα*. La familia de proteínas ROR (α , β y δ) activa la expresión de *Bmal1*, mientras que REV-ERB α y REV-ERB β la reprimen.

1.5. Mediciones en cronobiología

1.5.1. Actogramas

En cronobiología, cuando se registra una variable (serie de tiempo) la representación más común es un gráfico llamado actograma. En él se representan los días sucesivos en el eje de las ordenadas (Y) y las horas del día (de 0 a 24) en el eje de las abscisas (X). El momento de actividad se representa con una barra negra y usualmente se grafica en *double-plot*, es decir, con el gráfico duplicado en el eje X, para poder diferenciar mejor las distintas etapas durante el día, la noche y las transiciones. En condiciones de luz/oscuridad, el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora y por lo tanto su período es el del ciclo externo. En condiciones ambientales constantes, sin embargo, el período endógeno de los animales puede variar según la especie. Esto hace que, en ausencia de un ciclo de luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comiencen a estar activos cada día un poco antes o después. En la Figura 1.10 se muestra el actograma de una rata wild-type (cepa silvestre de laboratorio), es decir sin ninguna alteración o mutación en su reloj. Se observa que al pasar a condiciones de oscuridad constante (indicado con la flecha en la figura de la derecha) su actividad comienza cada día un poco más tarde, ya que su período endógeno es mayor a 24 horas. En condiciones constantes, dada la ausencia de señales ambientales, el animal mantiene sus ritmos según su reloj biológico: podemos así hablar de día subjetivo (aquel momento en que el animal se comporta como si fuera de día) y noche subjetiva (cuando el reloj endógeno indica que debería ser de noche).

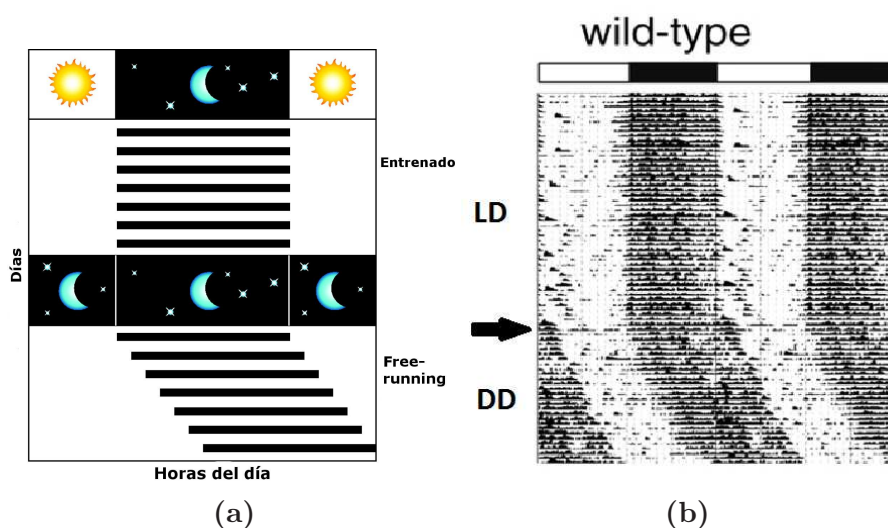


Figura 1.10: Actogramas en double-plot. (a) Esquema de un actograma. (b) Actograma representativo de la actividad locomotora en rueda de una rata wild-type expuesta bajo un ciclo de luz/oscuridad (LD) y luego en condiciones ambientales de oscuridad constante (DD). En ausencia de un ciclo sincronizador, la actividad de la rata comienza a desfasarse, ya que su período endógeno es un poco mayor a 24 horas.

1.5.2. Curva de respuesta de fase

El efecto del *zeitgeber* en función del momento del ciclo en el que se aplica fue observado por primera vez en algas por Pittendrigh [9]. Este fenómeno, representado por la “curva de respuesta de fase” (CRF), describe la variación de la respuesta de un organismo ante un estímulo sincronizador: dependiendo de cuando sea aplicado, el estímulo puede adelantar la fase, retrasarla o no tener ningún efecto, como se muestra en el ejemplo de la Figura 1.11. Los pulsos durante el día subjetivo, no tienen efectos (A). Si el pulso se aplica al final del día subjetivo o al principio de la noche subjetiva, se produce un retraso en su fase (B y C, respectivamente). Por último, los pulsos aplicados en la segunda mitad de la noche subjetiva producen adelantos de fase (D y E). Los adelantos o retardos de fase se representan en unidades de tiempo o en grados.

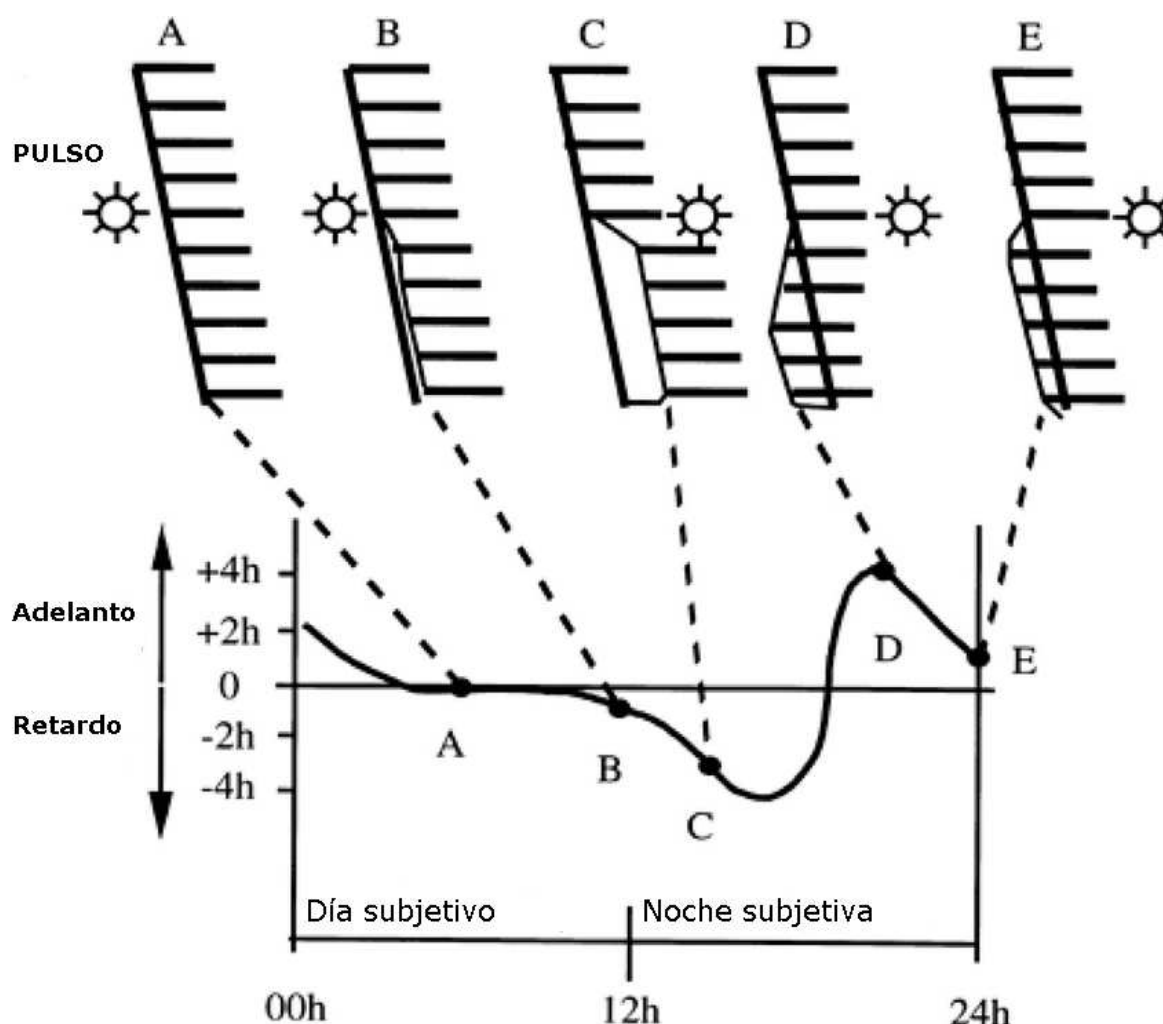


Figura 1.11: Ejemplo de curva de respuesta de fase para un animal nocturno. La CRF clásica muestra el efecto de un pulso de luz sobre el cambio de fase en la actividad locomotora de animales colocados en oscuridad constante. Luego de 4 días en un ciclo LD12:12, la rata pasa a DD. En el día 0 se aplica un pulso de luz de 15 minutos de duración. Figura tomada de <http://cronos.unq.edu.ar/tutorial.html>.

El estudio de las curvas de respuesta de fase en distintas especies ha conducido a

la formulación de las siguientes leyes:

- Las curvas de respuesta de fase están presentes en todas las especies.
- Son idénticas en un animal nocturno o diurno, es decir, para especies con el mismo período endógeno la CRF es igual sólo que desplazada 12 horas.
- Las curvas de respuesta de fase difieren entre individuos o especies en cuanto a la magnitud del efecto observado en la fase.
- Las curvas de respuesta de fase para la luz dependen de la intensidad del estímulo aplicado.
- Algunos de los efectos del *zeitgeber* sobre las curvas de respuesta de fase son inmediatos (los retardos de fase), mientras que otros sólo se manifiestan al cabo de unos días (los adelantos de fase).

Es destacable que las curvas de respuesta de fase indican que durante gran parte del ciclo diario, el estímulo luminoso es ineficaz para modificar el período circadiano. También es importante que la mayor eficacia del estímulo se da en las transiciones de luz a oscuridad o viceversa [47].

1.5.3. Periodograma

Para confirmar que además de rítmico un proceso es circadiano, necesitamos estimar su período. Muchos de los métodos asumen que el período es estacionario, por lo que si tenemos una serie de datos que sufre alguna perturbación que pueda inducir un cambio de fase, debemos calcular el período antes y después de la perturbación. Aquí vamos a presentar dos de los métodos más utilizados en cronobiología para estimar el período.

- Chi-cuadrado: Uno de los métodos más populares para estimar el período circadiano es el periodograma Chi-Cuadrado desarrollado por Sokolove y Bushell [48]. Dada una serie temporal, se calcula para un rango dado de períodos (por ejemplo entre 18 y 32 horas) los valores medios obtenidos al resolver una matriz resultado de seccionar la serie de datos de acuerdo con el periodo ensayado. El periodo más significativo es aquel que hace que la variación de las medias sea máxima. Este tipo de periodograma requiere un muestreo regular de los datos y disponer de información sobre unos 10 ciclos completos.
- Transformada de Fourier: la transformada de Fourier es un método basado en el ajuste de los datos con funciones coseno y seno que difieren en su período. El resultado es un espectro que muestra las frecuencias y amplitudes de los componentes individuales. La periodicidad dominante es aquella ajustada con mayor amplitud.

1.6. Objetivos de la tesis

El objetivo general de la tesis fue el estudio de los ritmos circadianos en tres organismos modelo: cianobacterias, ratones y la mosca *Drosophila*. El objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar mediante un modelo matemático el valor adaptativo del reloj utilizando cianobacterias como modelo. Analizar el efecto de la modulación de las horas luz en la competencia entre diferentes cepas reloj.
2. Estudiar el fenómeno de sincronización en el núcleo supraquiasmático, que es el reloj central en mamíferos. Analizar el rol de las interacciones entre los dos grupos de neuronas que conforman este núcleo y estudiar la formación de grupos sincronizados.
3. Desarrollar un dispositivo de monitoreo de la actividad locomotora de la mosca *Drosophila melanogaster* con alta resolución espacial y temporal. Realizar registros de moscas individuales rítmicas y arrítmicas y utilizar herramientas de la física estadística para estudiar los patrones circadianos obtenidos.
4. Analizar la influencia del reloj circadiano en el comportamiento de oviposición, cuantificando la puesta de huevos de moscas individuales normales y mutantes.

Capítulo 2

Cianobacterias

El valor adaptativo del reloj se demostró por primera vez utilizando cepas de cianobacterias. Se hizo competir una cepa con reloj normal, cuyo período es cercano a las 24 horas, y una cepa mutante con un período endógeno diferente bajo ciclos externos de distinta relación de luz y oscuridad. Se observó que la cepa con mejor *fitness*, es decir, con mayor tasa de reproducción, era aquella cuyo período endógeno era más cercano al período del ciclo externo de luz y oscuridad [49]. Sin embargo, estos experimentos fueron realizados con ciclos fijos, mientras que en la naturaleza la relación entre la cantidad de luz y oscuridad cambia de acuerdo a la estación. En este capítulo analizaremos el efecto de la modulación de la luz en la competencia entre cepas de cianobacterias utilizando un modelo teórico.

2.1. Introducción

Las cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, son microorganismos que, aunque desconocidos para muchas personas, ocuparon un rol fundamental en la historia del desarrollo del planeta. Fueron los primeros organismos en desarrollar la fotosíntesis oxigénica, con lo que inundaron la atmósfera de O_2 hace unos 2.500 millones de años. Antes de eso, la atmósfera tenía una química muy diferente, incompatible con la vida como hoy la conocemos, por lo que el resto de los organismos tuvo que adaptarse a la presencia de oxígeno [50].

Las cianobacterias siguen ocupando hoy un rol importante. Fueron los principales productores primarios de la biosfera durante al menos 1.500 millones de años, y lo siguen siendo en los océanos, teniendo un rol relevante en el ciclo de nitrógeno (N) y carbono (C). Son también un modelo biológico muy importante, ya que en algunos casos se conoce su genoma completo y son uno de los grupos más simples en los que se observa multicelularidad. Se utilizan en la industria para optimizar la generación de biocombustibles y son fuente de suplementos alimenticios, como la *Spirulina* [50].

Las cianobacterias son organismos procariotas (sin núcleo celular diferenciado) cu-

yas células miden sólo unos micrómetros (μm) de diámetro, pero son más grandes que la mayoría de las otras bacterias. Hay más de mil tipos catalogados, y habitan diversos ambientes, desde lagos congelados a volcanes y desiertos, pero su principal hábitat son los medios acuáticos. Son organismos fotosintetizadores, y comparten con otras bacterias la habilidad de usar el N_2 atmosférico como fuente de nitrógeno [51].

Comparadas con otros procariotas, las cianobacterias pueden ser células grandes, complejas y de una gran diversidad. Hay unicelulares, filamentosas, ramificadas, y con gran variación en el tamaño. Pueden también formar colonias con diferente grado de complejidad [52].

Son organismos que sólo tienen un ciclo de vida haploide, multiplicandose asexualmente por bipartición, produciendo poblaciones de células idénticas. Esto limita la recombinación genética en la población. Sin embargo tienen tres alternativas para solucionar esto. Pueden intercambiar material genético a través del pilus, que conecta dos células adyacentes, pueden absorber material genético libre o a través de virus. Las mutaciones también son comunes. Las colonias de cianobacteria se reproducen por fragmentación de filamentos, en la que un segmento de la colonia se rompe y se mueve deslizándose [51].

Las cianobacterias tienen una característica que muy pocos procariotas poseen y es la capacidad de llevar a cabo diferenciación celular. Esta diferenciación, que supone una expresión génica diferencial, lleva a la generación de células especializadas, como por ejemplo los heterocistos. Los heterocistos son células distribuidas a lo largo o al final del filamento, los cuales tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes, de tal manera que existe un continuo movimiento de los productos de la fijación de nitrógeno desde los heterocistos hacia las células vegetativas y de los productos fotosintéticos desde las células vegetativas hacia los heterocistos.

Todo ello hace de las cianobacterias organismos ideales para el estudio de la fotosíntesis, de la asimilación de carbono y nitrógeno, y en particular para estudiar el reloj circadiano en procariotas.

2.2. Reloj circadiano

Como ya mencionamos, los ritmos circadianos son la adaptación de todos los organismos al ciclo de luz-oscuridad terrestre de 24 horas. En el caso de las cianobacterias, son organismos cuya reproducción depende de la intensidad de luz, la temperatura y la humedad, pero en condiciones favorables la bipartición puede darse cada 4-5 horas. Debido a esto, durante muchos años los biólogos se negaron a creer que organismos tan simples como los procariotas pudieran haber evolucionado lo suficiente para tener ciclos circadianos, ya que su ciclo de vida es inferior a la duración de un día. Sin embargo, las cianobacterias no sólo tienen ritmos de aproximadamente 24 horas a nivel poblacional, pasando la información del tiempo de madres a hijas, sino que además son uno de los

pocos organismos en los que el valor adaptativo de los ritmos fue comprobado.

En 1985 fue descubierto el primer ritmo circadiano en procariotas: el de fijación de nitrógeno, el cual es regulado para ser máximo durante la noche [3, 14, 53]. En ese trabajo se utilizó la cianobacteria *Synechococcus* RF-1, la cual mostró ritmo sostenido durante cuatro días, con un free-running que fue decayendo de 26 a 22 horas [14]. Esta regulación nocturna es significativa evolutivamente porque la nitrogenasa, la enzima que rompe el nitrógeno atmosférico durante la fijación de nitrógeno, es inhibida por el oxígeno, y durante la fotosíntesis se produce oxígeno. De esta manera, el sistema circadiano separó dos procesos incompatibles: la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno [54]. Además, esto transformó a *Synechococcus* en uno de los modelos más simples para estudiar las bases moleculares del reloj circadiano.

En 1995, Liu *et al* [55] fueron capaces de identificar los genes que conforman el reloj principal en *Synechococcus elongatus*: kaiABC (*kai* es ciclo en japonés y ABC son los tres genes que lo forman). El mecanismo básico está regulado por la fosforilación de kaiC, como mencionamos en la introducción.

Si cualquiera de los tres genes kai sufre una mutación o es eliminado, el fenotipo circadiano es afectado, ya sea perdiendo ritmicidad o alterando la duración del free-running. Además, las células de *Synechococcus* parecen ser capaces de “recordar” en qué fase del ciclo circadiano se encontraban, de forma tal de transmitir a las células hijas esta información durante la división. Así, aunque cada célula de *Synechococcus* se divida varias veces en un día, la colonia completa mantiene su ritmo circadiano a lo largo del mismo [34, 56].

2.3. Ventanja intrínseca vs extrínseca

Una vez descubiertos los ritmos también en organismos simples como las bacterias, los biólogos comenzaron a preguntarse, dado que la adaptación al ciclo terrestre de 24 horas está presente en todos los organismos, cuál es la ventaja evolutiva que provee. Esto dió origen a dos hipótesis sobre la función de esta ventaja. La hipótesis de la *ventaja extrínseca* plantea que el reloj circadiano permite a los organismos anticiparse a los cambios predecibles, como es el ciclo de luz-oscuridad, para ajustar sus funciones biológicas como comer o reproducirse a la hora más conveniente de acuerdo a su entorno. En cambio, la hipótesis de *ventaja intrínseca* sugiere que el reloj circadiano permite una óptima coordinación temporal de las funciones fisiológicas [57]. En este caso, el reloj circadiano debería dar ventaja evolutiva tanto en ambientes con condiciones cíclicas como en condiciones constantes.

Para poder determinar cual de las dos hipótesis es la correcta, Woelfle junto a sus colaboradores evaluaron la *fitness relativa*, es decir, la capacidad que tiene una clase de organismos con respecto a otras de perpetuarse en la siguiente generación, en el caso de competencia entre distintas cepas de cianobacteria [49]. En sus experimentos utilizaron

una cepa de cianobacteria wild-type, cuyo período free-running es $\tau = 25$ horas y cepas mutantes en el reloj circadiano, tanto con períodos free-running más cortos ($\tau = 22$ horas) como más largos ($\tau = 30$ horas). Estas cepas crecieron en un mismo plato de Petri, compitiendo por el espacio y los recursos bajo ciclos externos de luz-oscuridad de distinta periodicidad. Ellos encontraron que la cepa que gana la competencia, es decir, que tiene mejor fitness relativa, es aquella cuyo período free-running es más cercano al período del ciclo LD. Esta diferencia en la fitness relativa se da aún cuando las tasas de crecimiento de cada cepa, al reproducirse sin competencia, no son significativamente diferentes, como puede observarse en el panel (B) de la Figura 2.1. Además, la cepa arritmica tiene mejor fitness que la wild-type cuando compiten en un ambiente de luz constante (LL), mientras que la cepa wild-type es vencedora bajo un ciclo LD12:12, sugiriendo que el ritmo endógeno es sólo una ventaja en ambientes cíclicos [49]. Esto se observa en el panel (C) de la figura, donde se grafica la fracción de cada cepa. En LD, la fracción de cepa mutante tiende a cero, y solo aumenta la fracción de cepa wild-type, mientras que con ciclos LL no hay diferencias significativas. Este trabajo dió una de las evidencias más fuertes a favor de la hipótesis de la ventaja en la fitness que implica tener sincronización entre el período endógeno y el período del ciclo dado por el ambiente.

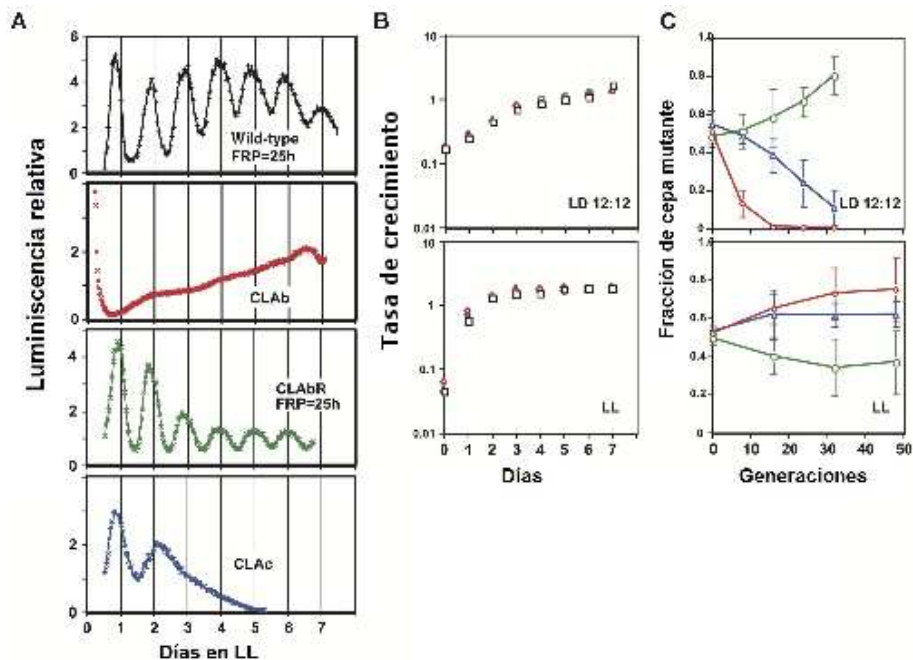


Figura 2.1: Fenotipos circadianos en cianobacteria. (A) Fenotipos circadianos de la cepa wild-type y tres mutantes en el gen *kaiC*. Se observa que la cepa wild-type y el mutante CLabR tienen oscilaciones con un free-running de 25 h, mientras que los otros dos son arrítmicos. (B) Tasa de crecimiento en cultivos puros en LL y LD12:12 (los colores corresponden a las cepas del panel (A)). (C) La diferencia en la fitness sólo se observa en condiciones periódicas. En ciclos LD, la fracción de cepa mutante tiende a cero, mientras que en ciclos LL no hay diferencias entre las cepas en comparación. Figura modificada de [49].

Ouyang et al. [58] propusieron dos mecanismos diferentes para explicar las diferencias entre la fitness de las dos cepas compitiendo en la misma cápsula de Petri: puede ser debido a la competencia por recursos finitos o debido a la secreción de un agente difusible que sea capaz de inhibir la reproducción de una cepa distinta de cianobacteria. Roussel et al. [59] propusieron modelos matemáticos para descubrir cuál de estas dos hipótesis era la más probable. Ellos encontraron que el modelo basado en la inhibición mutua era consistente con las observaciones experimentales de [58]. En este modelo el mecanismo de competencia esta dado por la secreción de un inhibidor de crecimiento, que es producido durante la fase de día subjetivo (sL) de las células.

Siguiendo esta propuesta sobre el mecanismo de competencia, Gonze et al [60] propusieron un modelo matemático sencillo para simular la competencia entre cepas, en el cual los parámetros utilizados en sus ecuaciones coinciden con los valores obtenidos en el trabajo experimental de Woelfle et al. [49]. Elegimos este modelo sencillo debido a que los parámetros del mismo fueron ajustados mediante experimentos realizados con *Synechococcus elegantus*. Por ejemplo, aún se desconoce cuál de los estados fosforilados de kaiC está involucrado en la activación y cuál en la supresión, debido a inconsistencias en los reportes. Si bien hay diferentes modelos matemáticos propuestos para los mecanismos moleculares del reloj en *Synechococcus*, ninguno de ellos ha sido verificado experimentalmente [38].

2.4. El modelo

Para el modelado de cada cepa de cianobacteria utilizamos el modelo de Gonze et al. [60], que está formado por un oscilador sensible a la luz, que representa el oscilador circadiano celular, acoplado mediante un inhibidor que difunde. Las ecuaciones de evolución de las células de la población N_i y el nivel del inhibidor I son:

$$\frac{dN_i}{dt} = k_i N_i \left(1 - \sum_{j=1}^n N_j\right), \quad \frac{dI}{dt} = \sum_{i=1}^n N_i \left(p_i - \frac{V_{max} I}{K_M + I}\right) \quad (2.1)$$

$$k_i = \begin{cases} k & \text{si } t \text{ está en L y la colonia } i \text{ está en sL o si } I < I_c \\ 0 & \text{en cualquier otro caso,} \end{cases} \quad p_i = \begin{cases} p & \text{si la colonia } i \text{ está en sL} \\ 0 & \text{en cualquier otro caso.} \end{cases} \quad (2.2)$$

En las ecuaciones, N_i representa la concentración de la cepa de cianobacteria i , k_i es la tasa de crecimiento de cada cepa, p representa la tasa de producción del inhibidor, V_{max} es la tasa máxima y K_M es la constante de Michaelis que caracteriza la degradación enzimática del inhibidor. L corresponde a los momentos de luz del ciclo externo y sL a los momentos del día subjetivo. Los valores de los parámetros utilizados para reproducir los resultados experimentales son $V_{max} = 1000$, $k = 1,8$, $I_c = 0,01$,

$p = 500$ y $K_M = 0,05$.

2.4.1. El oscilador circadiano

Al igual que en el trabajo de Gonze et al. utilizamos una versión modificada del oscilador de Van der Pol para producir oscilaciones sostenidas [60]. A pesar de su simpleza, este modelo matemático es capaz de describir oscilaciones circadianas.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= 24\frac{\pi}{12}(x_c + 0,13(\frac{x}{3} + \frac{4}{3}x^3 - \frac{256}{105}x^7) + B(t)), \\ \frac{dx_c}{dt} &= 24\frac{\pi}{12}(-x(\frac{24}{\tau_x})^2 + \frac{B(t)}{3}x_c - 0,15B(t)x)\end{aligned}\tag{2.3}$$

con

$$B(t) = (1 - \frac{x}{3})0,39\rho^{0,23}, \quad \rho = \begin{cases} 5 & \text{en fase luminosa (L),} \\ 0 & \text{en oscuridad (D).} \end{cases}\tag{2.4}$$

Estas ecuaciones fenomenológicas producen oscilaciones en la variable circadiana x con un período cercano a τ_x . La variable x_c es una variable complementaria y $B(t)$ representa el acoplamiento entre el ciclo externo de luz-oscuridad, que depende de la intensidad de luz ρ , y del oscilador celular. De esta forma, $B(t)$ es quien da la información sobre el momento del día L o D y $x(t)$ quien contiene la información sobre el tiempo subjetivo, sL o sD.

En la Fig. 2.2 hay un gráfico esquemático del modelo, donde se puede observar como el crecimiento de cada población está acoplado con el oscilador circadiano. Cada cepa crece sólo cuando su día subjetivo (fase sL) coincide con la fase luminosa externa (2) y cuando su noche subjetiva (sD) coincide con L pero sólo si la cantidad de inhibidor está por debajo del valor crítico I_c (1). El inhibidor es secretado en la fase sL y luego se degrada.

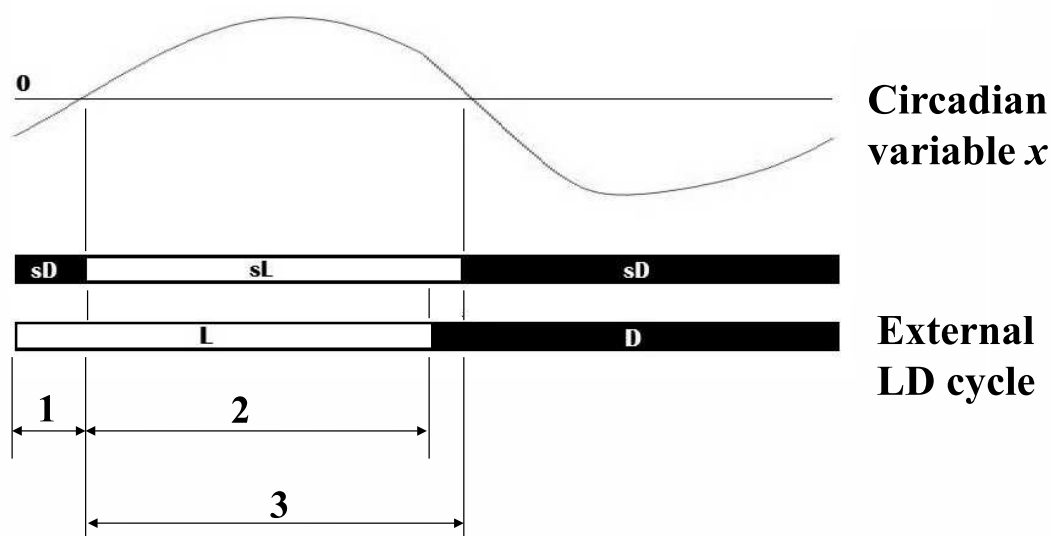


Figura 2.2: Esquema del modelo teórico del oscilador circadiano en cianobacterias. Explicación del funcionamiento del modelo hecha por Gonze et al. [60]. El inhibidor I es producido en 3, durante la fase sL, y es degradado el resto del día. Cada cepa crece en 1, si su fase sD coincide con L y $I < I_c$, y en 2, independientemente del nivel de I .

2.4.2. La modulación de las horas luz

Los experimentos y las simulaciones computacionales descriptas anteriormente fueron realizados utilizando intervalos de luz y oscuridad fijos. Sin embargo, en la naturaleza esto no es real. La relación entre la cantidad de horas de luz y oscuridad no es constante, ya que se modifica en las distintas estaciones. Partiendo de la hipótesis de que estos cambios estacionales pueden afectar la competencia entre las distintas cepas, estudiamos los efectos de la modulación en los tiempos de luz-oscuridad.

Desde hace mucho se conoce que las variaciones en la longitud del día generan una respuesta que se ve reflejada en un cambio fisiológico. En 1920, W. W. Garner y H. A. Allard estudiaron una variedad de tabaco que no florecía durante el verano, sino que lo hacía en otoño, cuando la duración del día era inferior a 14 horas. Basándose en la respuesta al fotoperíodo, dividieron las plantas en dos categorías: plantas de día corto para describir al tabaco y otras plantas que florecen a finales de verano y a principios de otoño, cuando los días son más cortos (como la soja y la violeta) y las plantas de día largo, que florecen en verano (como el trébol, las petunias y el trigo) [61]. Sin embargo, luego se descubrió que no es la duración del día lo crítico, sino la duración

de la noche [62].

En los animales la diapausa (estado dinámico de baja actividad en insectos), la migración o el comportamiento sexual son ejemplos de cambios anuales controlados por el fotoperíodo. Al llegar al fotoperíodo crítico, se desencadenan diversos procesos biológicos que se sincronizan con las estaciones, incluso en lugares cerca del ecuador, donde los cambios son muy sutiles.

En la Fig. 2.3 mostramos como la longitud del día depende de la latitud [63]. La figura compara la duración del día para el día 21 de cada mes en tres ciudades: Quito (Ecuador), que se encuentra cerca del ecuador en la latitud $0^{\circ}15'$, Jujuy (Argentina), que está localizada cerca del trópico de Capricornio en la latitud $24^{\circ}01'$ y Ushuaia, la ciudad más austral cuya latitud es $54^{\circ}48'$. Podemos observar que durante los equinoccios, las tres ciudades reciben 12 horas de luz.

En nuestro modelo, a pesar de que los cambios en el fotoperíodo no son constantes a lo largo del año y depende de las estaciones, decidimos modificar la longitud de la fase de luz en un monto fijo para simplificar las ecuaciones.

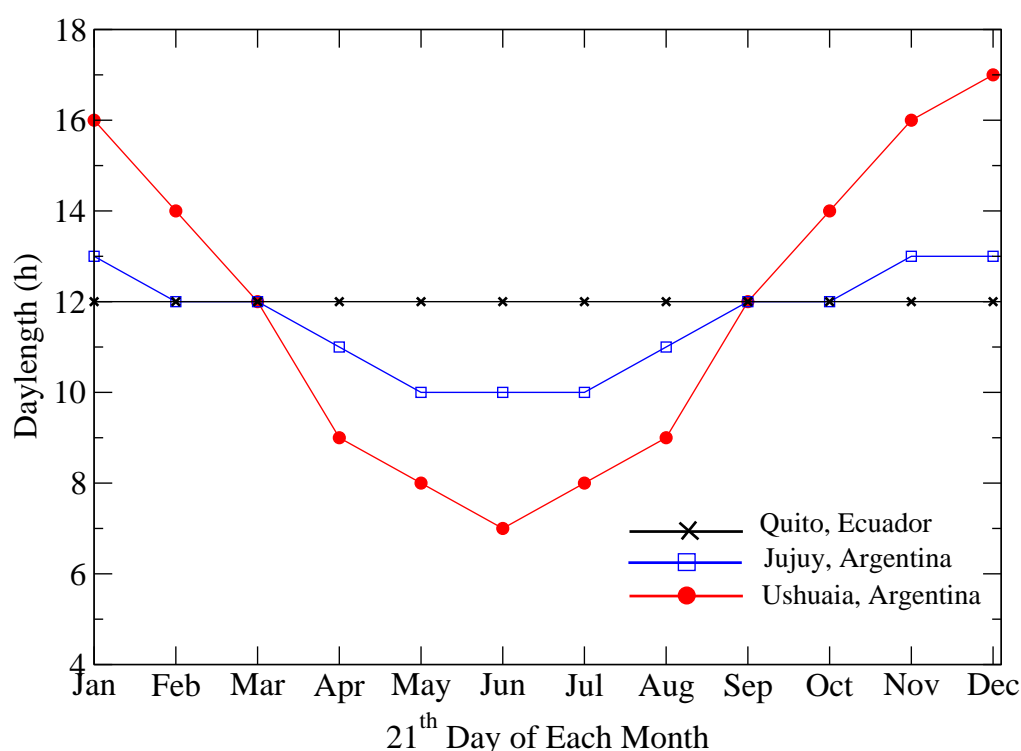


Figura 2.3: Duración del día durante 2012 para diferentes latitudes de Sudamérica. Cantidad de horas luz en Quito (línea del Ecuador), Jujuy (Trópico de Capricornio) y Ushuaia.

En las simulaciones, realizadas en Mathematica, para modelar las fluctuaciones en la longitud del día agregamos o quitamos minutos cada día al ciclo externo LD. Por ejemplo, si agregamos 12 minutos de luz por día a un ciclo LD12:12, luego de cinco días el ciclo externo de 24 horas tendrá 13 horas de luz y 11 de oscuridad.

2.5. Resultados

Comenzamos la competencia entre cepas con igual fracción de cepa wild-type ($\tau_x = 25h$) y mutante de período largo ($\tau_x = 30h$) y cantidades iguales de luz y oscuridad. Para reproducir las condiciones del experimento, donde las muestras eran diluidas y sampleadas cada 8 días [49], nosotros diluimos las cepas después de 8 ciclos de luz-oscuridad dividiendo por un factor 100 las variables N_1 , N_2 e I .

En primer lugar analizamos el caso en el que hay fases de coexistencia entre las dos cepas, como en los experimentos de Woelfle et al [49]. Cuando el período del ciclo externo LD es $T = 28$, corresponde a un valor intermedio entre el período free-running de ambas cepas, con lo que pueden coexistir por un tiempo largo. El objetivo de comenzar con este período del ciclo externo es ver si la modulación en la luz es capaz de romper la coexistencia. Efectivamente, cuando comenzamos a modificar el ciclo para que los días sean más largos y las noches más cortas, la coexistencia se termina, como se muestra en la Figura 2.4. Esto se debe a que los días más largos benefician al mutante de período largo.

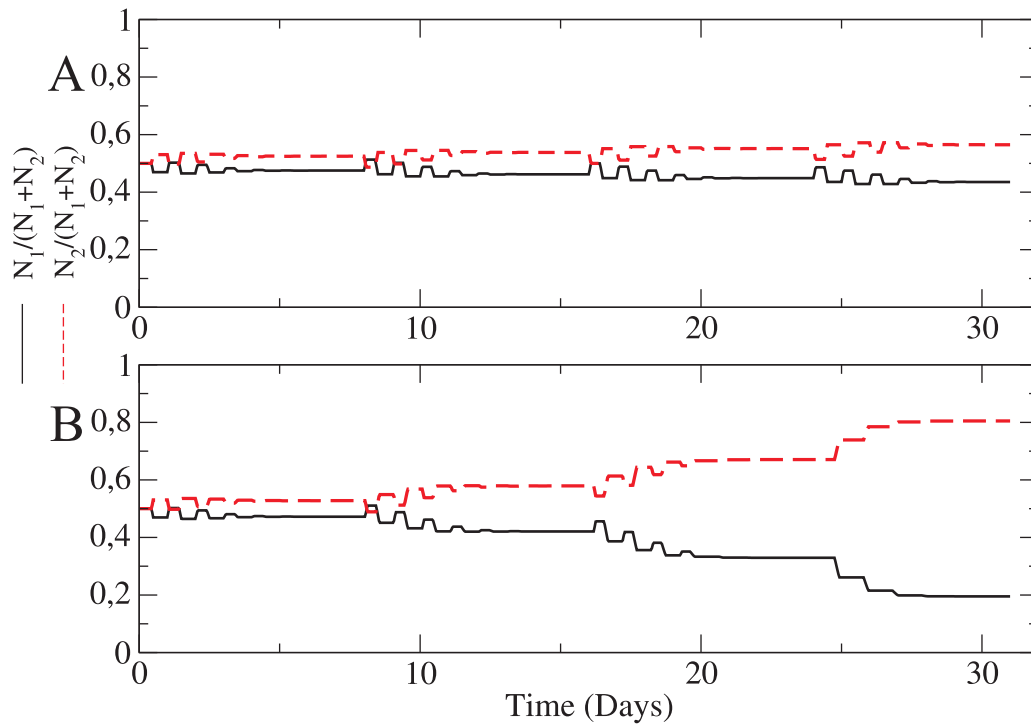


Figura 2.4: Competencia entre distintas cepas. (A) Resultado de la competencia entre la cepa wild-type (línea continua) y el mutante de período largo (línea punteada) donde se observa coexistencia para $T = 28$ h. (B) La coexistencia se termina luego de ≈ 8 días adicionando 3 minutos de luz por día. Ahora el mutante de período largo es capaz de ganar la competencia, ya que el fotoperíodo es más cercano a su período free-running.

En la Figura 2.5 podemos observar en el panel izquierdo la fracción de células wild-type como función del tiempo para un ciclo LD fijo (curva azul rayada) y en el caso en que agregamos 30 minutos de luz cada día (curva roja continua). En el panel (A), en el que los ciclos fijos son LD12:12, vemos que el primer día las curvas son similares, pero a partir del segundo día el mutante de período largo tiene un FRP más cercano al período del ciclo LD, con lo que la fracción de wild-type comienza a decrecer. En el panel de la derecha mostramos la fracción de células del mutante de período largo para el mismo caso.

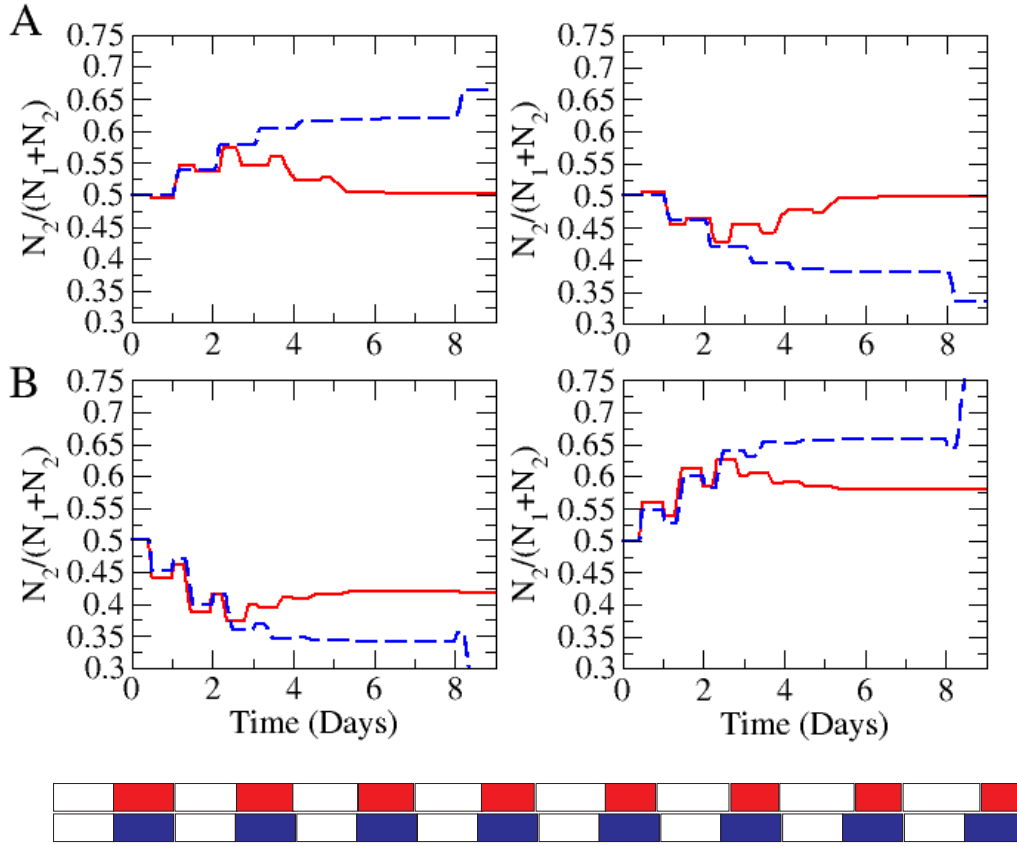


Figura 2.5: Efecto de la modulación de la luz en la competencia entre cepas. Vemos cómo afecta la modulación en la cantidad de luz (30 minutos por día) al resultado de la competencia entre la cepa 1 (wild-type, $\tau_x = 25$ h) y la cepa 2 (long-period mutant, $\tau_x = 30$ h) llevados a cabo en dos condiciones: (A) LD12:12 y (B) LD15:15. Se muestran la fracción de la cepa 1 (panel izquierdo) y de la cepa 2 (panel derecho) en función del tiempo; en rojo cuando hay modulación, es decir, la proporción de L y D cambian cada día, y en azul los ciclos fijos.

Nuestros resultados muestran una nueva forma de testear la competencia experimentalmente. Si bien ambas cepas no podrían coexistir en la naturaleza, ya que por los efectos estacionales una de ellas moriría, esto nos permite probar en el laboratorio, donde simular los cambios en la longitud del día es muy sencillo, si efectivamente es mediante un inhibidor que una cepa puede ganar la competencia. Probar las predicciones teóricas del modelo sería muy simple, ya que no es necesario diluir los cultivos. Como se muestra en la Figura 2.5, luego de ocho días de competencia entre las dos cepas, una diferencia de aproximadamente el diez por ciento entre las dos poblaciones debería ser observado para comprobar los resultados predichos.

Otro resultado interesante puede observarse en la Figura 2.6. En este caso, agregamos 12 minutos de luz cada día. Durante los primeros días, el crecimiento fue el esperado. La cepa wild-type pudo tener mejor fitness que la cepa mutante, ya que el ciclo externo era LD12:12. Sin embargo, luego de ocho días, cuando la fase luminosa tenía

más de 13 horas, un crossover es observado. La cepa mutante comenzó a tener mejor rendimiento, ya que su período endógeno se volvió más cercano al del ciclo LD. Esto también podría ser testeado experimentalmente, aunque en este caso si sería necesaria la dilución de las muestras cada 8 días.

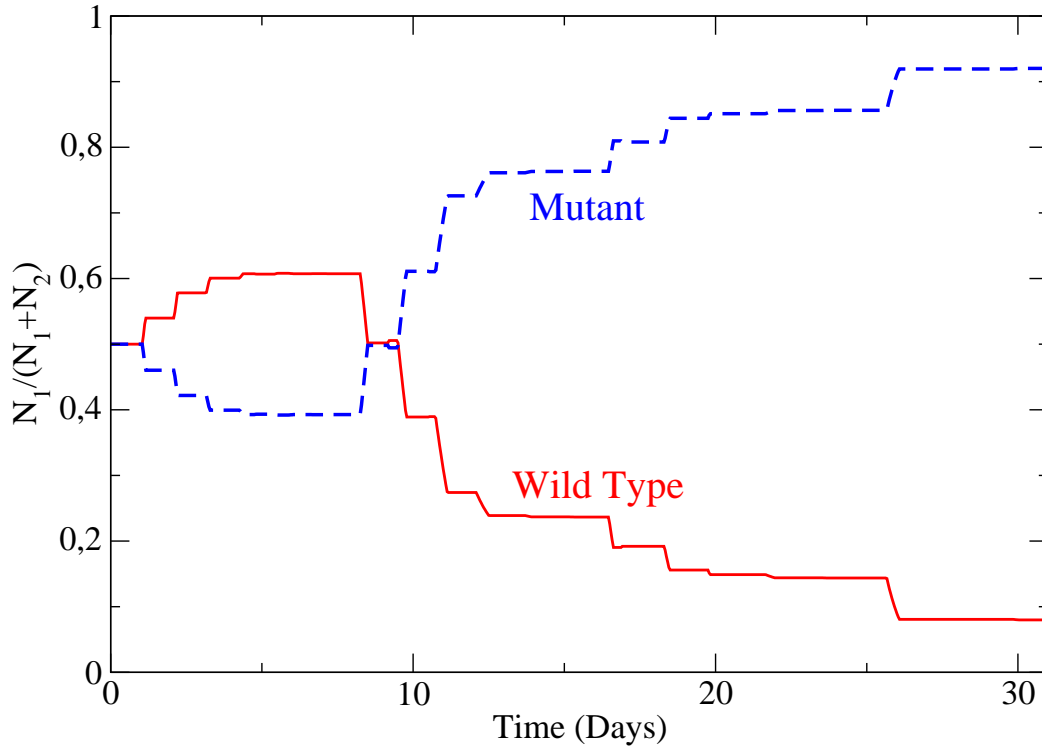


Figura 2.6: Crossover en la competencia debido a la modulación en la luz. Competencia entre una cepa mutante de período largo y una cepa wild-type en un ciclo LD12:12 para los mismos parámetros que en la Figura 2.5, pero agregando 12 minutos de luz al ciclo por día. Se observa un crossover luego de 8 días.

2.6. Conclusiones

Es probable que el reloj circadiano proporcione una ventaja adaptativa en todos los reinos, ya que la resonancia entre el reloj interno y el ciclo de luz-oscuridad externo asegura una relación de fase óptima entre la fisiología y el medio ambiente en el que el individuo está inmerso, permitiendo una mayor aptitud. Esto ya se probó en cianobacterias [49], realizando un experimento pionero en el que se puso en competencia dos cepas con distintos relojes en ciclos externos. Encontraron que la cepa con un reloj endógeno con período más cercano al período del ciclo externo de luz y oscuridad tenía mejor tasa de reproducción. Este experimento fue el primero en poder mostrar la importancia adaptativa del reloj, y sentó un protocolo para realizar el mismo experi-

mento en otras especies. Siguiendo esta idea, recientemente se probó el valor evolutivo del reloj en plantas [64]. Utilizando la planta *Arabidopsis* y poniendo en competencia a dos plantas con distintos relojes, se obtuvo que un período del ciclo externo diferente al endógeno reduce el contenido de clorofila de las plantas, reduce el crecimiento y aumenta la mortalidad.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes en la mejora del fitness aún no se conocen. En el caso de las cianobacterias varios modelos han sido propuestos, todos con evidencia a favor y en contra [65]. En este trabajo utilizamos un modelo que basa la interacción entre las cepas en un inhibidor difusible en el medio de cultivo. Nuestro estudio estuvo motivado por las fluctuaciones en las horas luz del día a lo largo del año, las cuales suelen verse reflejadas en el comportamiento de los organismos. Nosotros estudiamos como estas fluctuaciones en la cantidad de luz afectan la competencia entre cepas de cianobacteria con relojes con períodos endógenos diferentes.

Encontramos que la parte estacional no parece ser quien controla la dinámica de la competencia entre cepas distintas, ya que es demasiado lento el cambio y no permite la adaptación de los relojes, de forma que la cepa desfavorecida se muere. En contraposición, propusimos un protocolo para hacer experimentos sin hacer diluciones, lo cual implica trasvasar las cianobacterias en diferentes cápsulas de Petri. Haciendo uso de la modulación de la luz, es posible influenciar las poblaciones de cianobacterias en períodos de tiempo muy cortos. De esta forma, se pueden evaluar los resultados de las simulaciones computacionales y nuestra predicción en la composición de las dos cepas luego de sólo ocho días de competencia podría ser verificada. Así se podría estudiar la influencia del reloj en períodos cortos siguiendo un protocolo muy simple.

Capítulo 3

Mamíferos

En este capítulo se estudiará un modelo matemático del proceso de sincronización entre dos grupos de osciladores acoplados basados en la evidencia experimental de la existencia de dos grupos de neuronas en el reloj de los mamíferos. Dicho modelo pretende analizar el comportamiento del sistema frente a distintos acoplamientos a partir de la fase y la frecuencia.

En primer lugar se hará una introducción al reloj de los mamíferos, en cuanto a su composición anatómica y molecular, y se comentará la experiencia en el análisis de datos del reloj de ratones durante una visita en el laboratorio del Dr Hanspeter Herzel en el Instituto de Biología Teórica en Berlin, Alemania. Luego se introducirá el modelo matemático que utilizamos para estudiar las propiedades de sincronización entre ambos grupos. Por último, mostraremos los resultados que obtuvimos junto a las conclusiones del capítulo.

3.1. Introducción

Los roedores han tenido un fuerte impacto en la vida de los humanos desde los comienzos de la civilización. Pasaron de ser una plaga culpable de enfermedades a ser utilizados como mascota doméstica. Actualmente, los roedores, en particular el ratón *Mus musculus*, son uno de los principales organismos modelo en biología y medicina para comprender los procesos de los mamíferos [66].

Para muchos científicos durante la década de 1930, los ratones eran la elección obvia para los experimentos genéticos en mamíferos, ya que son pequeños, prolíficos, de corto período gestacional y se adaptan fácilmente a la vida en bioterios, además de generar menos empatía en la población no científica que gatos o monos [67]. Pero también resultó que humanos y ratones no sólo compartimos el 99 por ciento de nuestros genes, sino que también tenemos las mismas enfermedades hereditarias como diabetes, cáncer, glaucoma, obesidad, anemia, hipertensión, asma y enfermedades neurológicas [68]. Es por esto, junto a las siguientes técnicas de manipulación genética desarrolladas

en ratones, que el ratón es el principal organismo modelo para estudiar los mamíferos [69]:

- Creación de ratones transgénicos mediante la inyección de secuencias de ADN en un embrión.
- Creación de ratones con desactivación génica o *knock-out*, en los cuales un gen es desactivado por completo, ayudando a hallar la función del gen.
- Capacidad de insertar secuencias específicas en lugares determinados del genoma.

3.2. Reloj circadiano en mamíferos

A mediados del siglo XX, Curt Richter encontró el área aproximada del cerebro donde se encuentra el reloj circadiano de los mamíferos. A través de una serie de experimentos pioneros en los cuales lesionó el cerebro de ratas, descubrió que el comportamiento circadiano del animal sólo se veía afectado al lesionar un área específica: la parte frontal del hipotálamo localizado sobre el quiasma óptico. En 1972, Robert Moore [70] a través de la vía retinohipotalámica llegó hasta los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), y luego de una ablación bilateral halló pérdida de ritmo en la secreción de hormonas y actividad locomotora y de bebida. Experimentos posteriores en los que se hicieron transplantes de NSQ normales en ratones mutantes mostraron que la ritmicidad puede ser recuperada [26, 71]. Experimentos similares en otros mamíferos confirmaron que el reloj central se encuentra en el núcleo supraquiasmático.

3.2.1. El reloj maestro

En los organismos pluricelulares, la expresión oscilatoria de cada célula debe ser sincronizada por una estructura jerárquicamente superior para poder dar lugar a los ritmos circadianos. Como ya mencionamos, en los mamíferos se encontró que el núcleo supraquiasmático constituye el reloj central. El núcleo supraquiasmático contiene aproximadamente 20000 neuronas, cada una de las cuales contiene un oscilador celular autónomo. Estructuralmente, cada uno de los lóbulos del NSQ puede ser dividido en dos regiones claramente identificables: la región ventrolateral (VL) o *core* y la región dorsomedial (DM) o *shell*, como se puede observar en la Figura 3.1. El core recibe la información lumínica, principalmente a través del tracto retino-hipotalámico y transmite esta información al shell, permitiendo la sincronización con el ambiente. Sin embargo, las propiedades de sincronización de cada grupo son diferentes. Las oscilaciones en las células del core son de baja amplitud, lo que permite la sincronización con el ambiente, mientras que las oscilaciones en el shell son robustas, dando lugar a oscilaciones aún en ausencia de información del ambiente. Además, las regiones VL y DM expresan diferentes neurotransmisores para sincronizar sus señales. Las neuronas del core expresan

principalmente polipeptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que la mayoría de las neuronas de la zona DM expresan arginina vasopresina (AVP).

A pesar de toda esta heterogeneidad, los multiples osciladores son capaces de generar ritmos coordinados en el NSQ “in vivo” [60]. Sin embargo, a nivel de cada oscilador celular, hay un amplio rango en los periodos circadianos que varían de 22 a 30 horas [72, 73] y en las fases [74, 75]. Es por esto que el acoplamiento entre las diferentes neuronas que forman el NSQ parece ser crítico para el correcto y preciso funcionamiento del oscilador maestro.

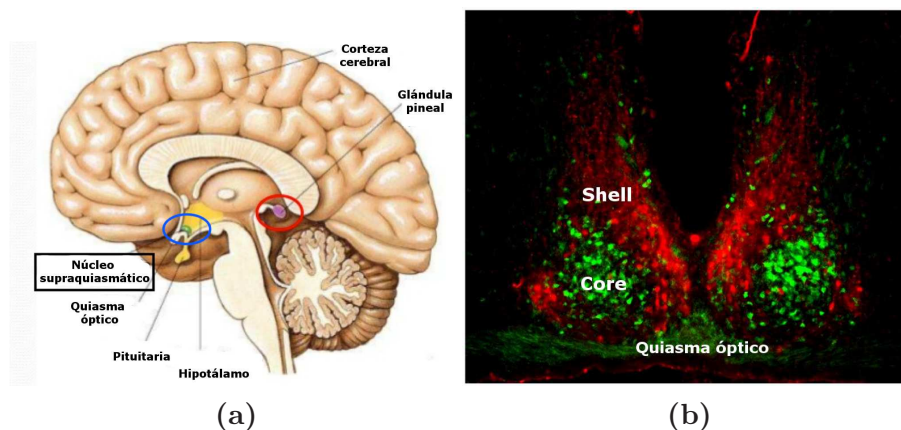


Figura 3.1: Núcleo supraquiásmico, reloj maestro en mamíferos. (a) Ubicación en el cerebro humano del núcleo supraquiásmico. (b) Fotomicrografía de una rebanada de cerebro donde se observa los neuropéptidos en cada una de las regiones del NSQ. En rojo se marcó el neuropéptido AVP y en verde el neuropéptido GPR. Figura modificada de [76]

Vías de entrada al reloj

El principal *zeitgeber* que tienen los mamíferos es la luz, por lo cual los ojos son necesarios para la sincronización con el ciclo de luz-oscuridad. Para mantener informado al NSQ sobre qué está pasando en el ambiente, la principal vía fisiológica desde las células ganglionares de la retina a los NSQ es el tracto retino-hipotálamico (TRH). En los somas de las células ganglionares se expresa el pigmento melanopsina y el principal neurotransmisor que utilizan estas neuronas para hacer sinápsis es el glutamato (GLU).

Vías de salida

Las vías de salida del NSQ transmiten información a otras zonas del cerebro involucradas en la regulación de los patrones de comportamiento, sueño-vigilia y de temperatura corporal, y a los centros neuroendócrinos. El NSQ traduce la información del ambiente a través de códigos neurales y humorales, los cuales dan la fase de oscilación. Muchas de las eferencias son cortas y terminan en el mismo NSQ o en el área subparaventricular, llegando a otras zonas hipotalámicas, como el núcleo paraventricular (NPV), que tiene conexión con la glándula pineal. Esta es una de las vías más

estudiadas, ya que controla la secreción de melatonina. Esta hormona está implicada en la regulación del sueño y en la ritmicidad circadiana y circanual [77].

3.2.2. Los relojes periféricos

En el organismo no hay un sólo reloj, sino un montón de relojes distribuidos en todos los órganos. El NSQ tiene influencia en otros tejidos u órganos, lo que hizo pensar que estos tejidos también deberían contener células que cuenten con osciladores circadianos moleculares. Tiempo más tarde fueron encontradas las mismas proteínas reloj expresadas en el NSQ en cultivos celulares de corazón, riñón, hígado y páncreas entre otros [78]. Recientemente se descubrió que el tejido adiposo también tiene células reloj. La liberación de moléculas por parte de estas células para regular el hambre tiene un marcado ritmo circadiano [79]. A estos osciladores se los llama “periféricos”, ya que no están en el cerebro. Estos osciladores no son autónomos, ya que sin el control del NSQ se desincronizan y pierden amplitud en sus oscilaciones [80]. Mientras que las oscilaciones de las células del NSQ persisten por un mes en cultivo, la expresión circadiana de células de tejidos periféricos se pierde en 2 a 7 días [81].

Por otro lado, se ha visto que algunas señales, como cambios en el horario de alimentación, alteran la expresión circadiana de los genes reloj en el hígado y otros tejidos periféricos, pero no afectan su expresión en el NSQ. Esto sugiere que bajo ciertas condiciones, el control del ritmo de los osciladores periféricos se puede desacoplar del control del NSQ, para adaptarse a condiciones particulares sin afectar al reloj central. Esto a su vez permitiría optimizar la fisiología celular, de tal forma que se restrinja la expresión de ciertos genes cuando sus productos son requeridos. Cuando estas condiciones particulares desaparecen, el NSQ puede sincronizar a los osciladores periféricos de regreso a su ritmo normal [81]. Por lo tanto, la jerarquía de los relojes permite adaptarse mejor a las condiciones ambientales, como la accesibilidad a alimento.

3.2.3. El reloj molecular

Como ya mencionamos, la estructura del reloj se mantiene en todos los reinos: los llamados genes reloj y las proteínas que estos codifican interactúan de forma tal de dar lugar a oscilaciones moleculares a través de mecanismos de autoregulación negativa. Muchos de los genes reloj se expresan en forma oscilatoria, como los genes reloj period 1 y 2 (*per1* y *per2*), criptocromo 1 y 2 (*cry1* y *cry2*) y Bmal1, mientras que otros, como Clock, se expresan en forma constante [82].

En el caso de los mamíferos, el mecanismo molecular del reloj está compuesto de dos ciclos (loops) de retroalimentación negativa conectados. En el loop principal, las proteínas de los genes Bmal1 y Clock, BMAL1 y CLOCK respectivamente, forman el dímero BMAL1- CLOCK que se unen a los E-box (genes objetivo), que son regiones promotoras que activan la transcripción de varios genes: Per, Cry y Rev-erba. Luego,

cuando las proteínas PER y CRY están sintetizadas, forman complejos que al ingresar al núcleo actúan como reguladores negativos inhibiendo directamente su propia transcripción al desplazar al complejo BMAL1-CLOCK de su sitio de unión con la E-box. Esto inhibe la transcripción de Per y Cry y, por consecuencia, hay una reducción de los niveles de PER-CRY, lo que permite que BMAL1-CLOCK vuelva a unirse a la E-box para iniciar nuevamente el ciclo [83, 84].

En el loop auxiliar, cuando BMAL1-CLOCK se une a la E-box, induce la transcripción del gen Rev-Erb α . Luego, la proteína REV-ERB α transloca al núcleo e inhibe la transcripción del gen Bmal1. Por lo tanto, cuando los complejos PER-CRY desplazan a BMAL1- CLOCK de la E-box, la disminución en la transcripción de Rev-Erb α permite la transcripción de Bmal1, restableciendo los niveles de la proteína BMAL1. Este loop no es esencial para la generación de ritmos, pero le da mayor robustez [27, 85].

Estos loops tardan aproximadamente 24 horas en completar un ciclo. Esto es gracias a los procesos post-traduccionales, como la fosforilación y la ubiquitinación, que están mediados por las proteínas Caseina Kinasa epsilon (CK1 ϵ) y Caseina Kinasa delta (CK1 δ). Mutaciones en estas enzimas producen severos daños en el reloj. Por ejemplo, en los humanos, mutaciones en estos genes son las responsables del síndrome de la fase del sueño avanzada, en el que los afectados se duermen anormalmente temprano y despiertan antes de lo previsto [12].

3.2.4. Acercamiento a datos experimentales

En el grupo del Dr Hanspeter Herzog, en el Instituto de Biología Teórica de la Universidad Humboldt de Berlin analicé datos del laboratorio del Dr. Jihwan Myung en Osaka, Japón. Recientemente, el grupo experimental de Jihwan Myung [86] realizó un estudio donde se encontró que el período de oscilación de la expresión de BMAL1 es específico a las distintas subregiones del NSQ. También observaron que el acoplamiento no afecta fuertemente el período de las oscilaciones, con lo que concluyeron que los períodos forman la base de la codificación de las estaciones en el NSQ.

El objetivo de este proyecto fue continuar esta línea de cuantificación, analizando y modelando datos experimentales de este grupo de la respuesta del NSQ ante cambios de concentración del principal neurotransmisor en el medio de cultivo, VIP, midiendo la bioluminiscencia de otro de los componentes del reloj molecular, Per2.

El experimento se realizó utilizando ratones transgénicos *knock-in* PER2::LUC, es decir, con una luciferasa. Los ratones fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad (LD) de 12 horas y decapitados entre 30 y 60 días postnatales. El NSQ se cortó en rodajas, que a su vez fueron microseccionadas quirúrgicamente en subregiones dorsal y ventral y cultivadas por separado. Debido a la semejanza esquemática de las microsecciones con una bola de arroz 'onigiri' japonesa, llamaron a las microsecciones 'onigiri'. Las secciones elementales onigiri del NSQ fueron aisladas en forma dorsal (D), ventral (V)

y total (W) (Figura 3.2). Luego se tomaron imágenes de la bioluminiscencia de las microsecciones, como se observa en la Figura 3.2. Cuanto más oscura es la imagen mayor expresión de PER2 hay en esa sección. Las imágenes fueron filtradas para remover el ruido y se les aplicó un kernel para transformarlas en una grilla, donde cada celda corresponde a un pixel. Las oscilaciones se definen como las series temporales de bioluminiscencia obtenidas de cada celda. A las 72 horas se aplicó el neuropéptido VIP al medio sobre el cual se encontrabas las rodajas de NSQ con el objetivo de evaluar el rol de éste en los períodos de cada oscilador.

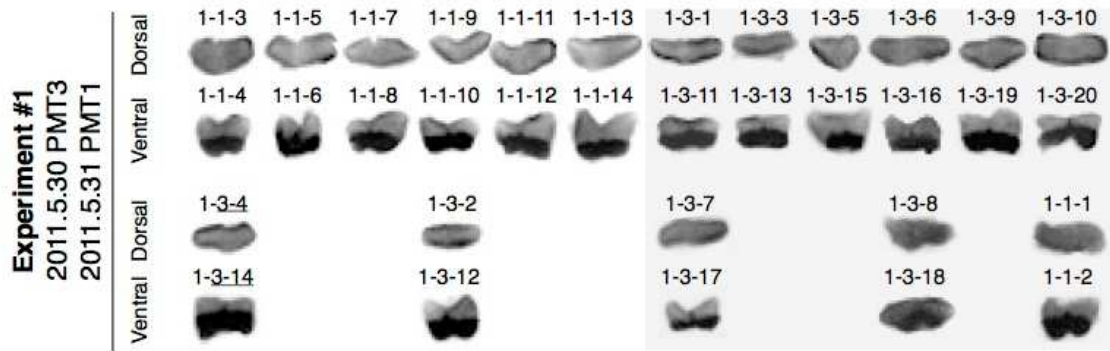


Figura 3.2: Bioluminiscencia en rodajas del núcleo supraquiasmático de ratón. Señal de bioluminiscencia de PER2::LUC en la región ventral y dorsal del NSQ a un tiempo dado para los distintos cortes realizados.

Se aplicó un filtro Hodrick-Prescott a los datos crudos para obtener la componente cíclica de la serie temporal. El filtro de Hodrick-Prescott separa una serie de tiempo y_t en una componente secular o de tendencia T_t y un componente cíclico C_t tal que $y_t = T_t + C_t$. Es equivalente a un spline cúbico más suave, con la porción suavizada en T_t . La función del filtro tiene la forma $\sum_{t=1}^m C_t^2 + \lambda \sum_{t=2}^{m-1} ((T_{t+1} - T_t) - (T_t - T_{t-1}))^2$. Luego de aplicar el filtro, las oscilaciones en la bioluminiscencia de PER2::LUC en algunos canales se pudieron observar mejor.

Para poder medir el período y la fase de las oscilaciones, las curvas fueron ajustadas. Dado que las oscilaciones de bioluminiscencia en todos los canales iban perdiendo amplitud progresivamente a lo largo de las horas, se eligió probar con un coseno amortiguado:

$$f(t) = A \exp^{-\lambda t} \cos(\omega t + \phi) \quad (3.1)$$

Los valores de los parámetros fueron calculados usando la función curvefit del paquete Scipy en Python. Un ejemplo de la señal de un canal que pudo ser filtrada y ajustada puede observarse en la Figura 3.3. Varias de las señales no presentaban oscilaciones o no pudieron ser bien ajustadas. Dos ejemplos de ello son mostrados en las Figuras 3.4 y 3.5.

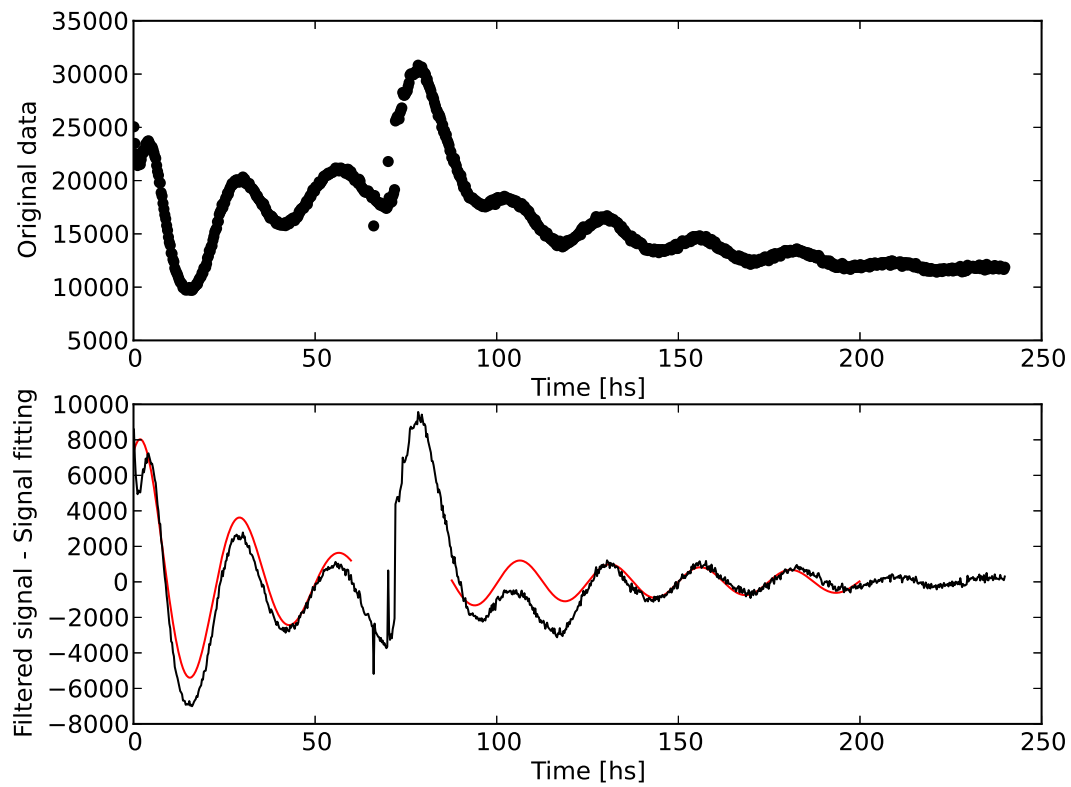


Figura 3.3: Bioluminiscencia de PER2::LUC para uno de los canales ajustados. Ejemplo de la señal original, la filtrada y la ajustada para uno de los canales. En este caso se observan oscilaciones. La ventana temporal de la aplicación de VIP no fue considerada para el ajuste.

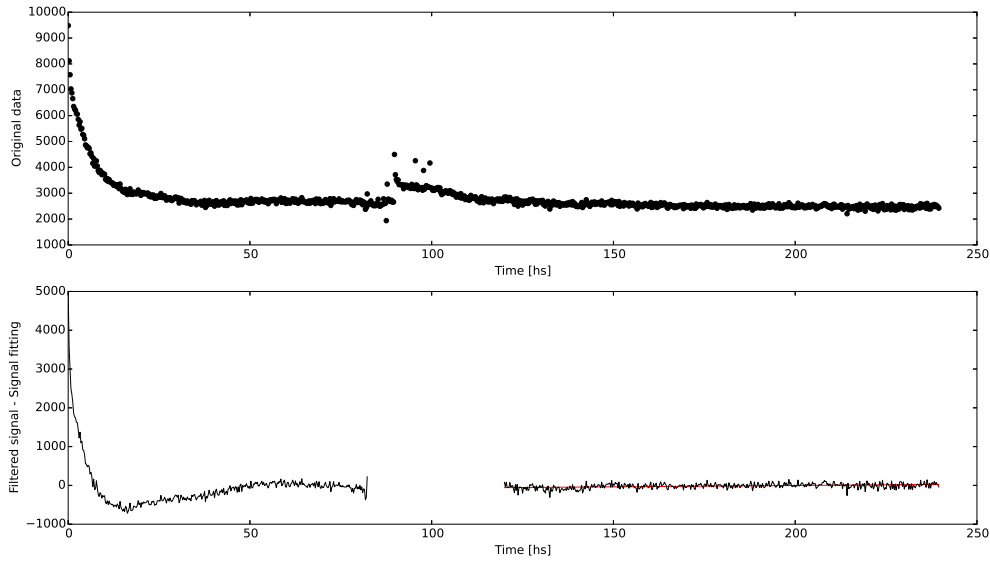


Figura 3.4: Señal de bioluminiscencia de PER2::LUC para un canal sin oscilaciones. Ejemplo de una señal en la que no se encontraron ritmos periódicos.

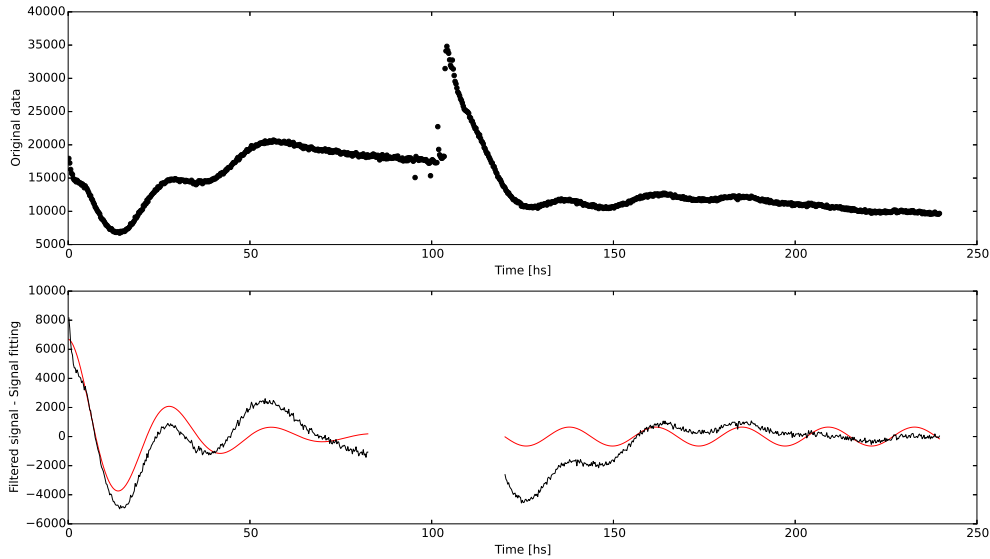


Figura 3.5: Señal de bioluminiscencia de PER2::LUC para un canal no ajustado. Ejemplo de señales en las que las oscilaciones no son significativas.

El período fue calculado como $2\pi/\omega$. En la Figura 3.6 se graficó el período de las oscilaciones tanto antes como después de las aplicación de VIP para las neuronas dorsales (D), ventrales (V) y para todo el cerebro (W) de los canales que pudieron ser ajustados.

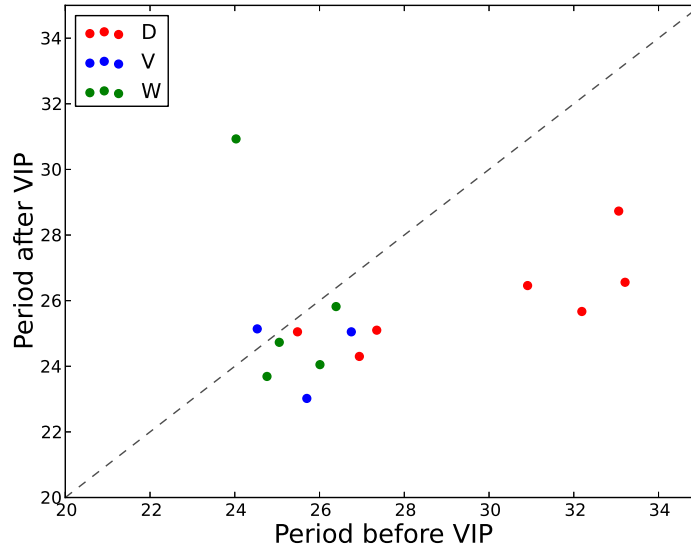


Figura 3.6: Períodos de los datos que pudieron ser ajustados antes y después de la aplicación de VIP. Luego de aplicar el neurotransmisor VIP, los períodos de gran parte de las células se acercan a las 24 horas.

Puede observarse en la Figura 3.6 que en promedio el período de las oscilaciones luego de aplicación de VIP es más cercano a las 24 horas. Al haber presencia del neurotransmisor, se esperaba justamente que la distribución heterogénea de períodos de las neuronas individuales se reduzca a un período único cercano al día. Sin embargo, tanto antes como después de la aplicación de VIP, se encontraron períodos mucho más largos que lo razonable. Esto puede deberse a algún artefacto en el protocolo del experimento o bien a que los datos probablemente no hayan sido ajustados en forma correcta debido a la baja amplitud de las oscilaciones.

Como conclusión de esta experiencia analizando datos de bioluminiscencia de rodajas de NSQ de ratón, aprendí la dificultad de analizar datos de experimentos complejos. Debido a la dificultad en las mediciones experimentales, las oscilaciones obtenidas eran de baja amplitud, por lo que medir los períodos de las mismas no fue sencillo. Sin embargo, a través del ajuste de las señales se logró obtener datos para varias de las series temporales.

3.3. El fenómeno de sincronización

Reconocido por primera vez por Christiaan Huygens en 1665, el fenómeno de sincronización es muy frecuente en la naturaleza. Sistemas como relojes, marcapasos cardíacos o el aplauso de una audiencia muestran una tendencia a funcionar en forma sincronizada [87].

3.3.1. Perspectiva histórica

El origen de la palabra sincronización es de raíz griega y significa “ocurrir en el mismo tiempo”. El significado original de esta palabra se ha mantenido hasta hoy en el uso coloquial, como un acuerdo o correlación en el tiempo de diferentes procesos.

La primera descripción del fenómeno de la sincronización fue presentada en el siglo XVII por Christiaan Huygens. Él observó que dos relojes de péndulo, luego de un período de tiempo, oscilaban con el mismo ritmo. Además, notó que oscilaban en antifase: los péndulos se movían en direcciones opuestas, con una diferencia de fase igual a π . Curiosamente, esto sucedía aún si los dos péndulos no eran idénticos. Huygens comprobó que este comportamiento solo aparecía si los péndulos eran colgados de ganchos colocados en la misma viga de madera. A partir de esta observación, supuso que la sutil interacción a través de la viga de madera era lo que daba lugar a un comportamiento colectivo: la *sincronización*.

Huygens estaba en lo cierto, ya que se ha demostrado que este fenómeno depende de las propiedades de las interacciones entre los osciladores. Otra característica a destacar es que la sincronización es un efecto esencialmente no lineal y ha sido encontrado en muchos sistemas físicos, incluyendo los sistemas caóticos, en los cuales fue observada por primera vez por Pecora y Carrol [88].

3.3.2. Algunas definiciones

En general, sincronización significa un ajuste en los ritmos de objetos oscilantes debido a una débil interacción. Existen varios ejemplos de osciladores en diferentes campos: circuitos electrónicos, láseres, reacciones químicas o las células del nodo sinusal del corazón. Hay algunas características que son comunes a todos los osciladores auto-sostenidos: (i) el oscilador autosostenido es capaz de mantener el mismo ritmo mientras que una fuente de energía esté disponible, (ii) la forma de la oscilación está determinada por parámetros internos del sistema y (iii) la oscilación es estable ante pequeñas perturbaciones. Uno de los principales atributos de un sistema oscilatorio es el tiempo que necesita para repetir el evento. En un oscilador periódico, este tiempo está determinado por el período de la oscilación T . La inversa del período define la frecuencia $f = 1/T$ del oscilador. La frecuencia angular está definida por $\omega = 2\pi f = 2\pi/T$, y también es llamada “frecuencia natural”. Otra cantidad importante que caracteriza al oscilador es la fase. La señal $x(t)$ del oscilador puede ser escrita como

$$x(t) = A(t)e^{i(\omega t + \phi_0)},$$

donde $A(t)$ es la amplitud de la oscilación, ω la frecuencia angular y ϕ_0 la fase inicial del oscilador. Esta fase juega un rol importante en la identificación de la sincronización.

Cuando dos o más osciladores con diferentes frecuencias intrínsecas están débilmente

acoplados pueden ajustar sus ritmos y comenzar a oscilar con una frecuencia común. Este fenómeno es conocido como *phase-locking*. Si dos osciladores no idénticos tienen sus propias frecuencias f_1 y f_2 , la diferencia de frecuencias $\Delta f = f_1 - f_2$ cuantifica que tan diferentes son los osciladores acoplados. Si la diferencia de frecuencias en el sistema sin acoplamiento no es muy grande, se produce el *phase-locking*.

Además del *phase-locking*, para que se produzca la sincronización es necesaria una interacción adecuada entre los osciladores. En una situación experimental no siempre es claro cómo medir esta cantidad. Por ejemplo, en el experimento descrito por Huygens, depende del tipo de viga que se utilice. Si la viga es totalmente rígida, el movimiento del péndulo no afecta el soporte, y entonces no hay forma de que los dos relojes interactúen, es decir, la fuerza de acoplamiento es cero. Por el contrario, si la viga no es rígida, sino que puede vibrar o doblarse en cierta medida, existirá una interacción entre ambos relojes que permitirá la sincronización. Finalmente, una viga demasiado blanda, tampoco conducirá a una sincronización de los relojes.

Si dos osciladores se mueven en la misma dirección y casi simultáneamente, entonces sus fases ϕ_1 y ϕ_2 se parecen y su estado es llamado *sincronización de fase*. Si los dos osciladores se mueven en direcciones opuestas, el estado de sincronización se llama en *antifase*, esto es la diferencia de fase es π radianes [87].

3.3.3. El modelo de Kuramoto

Para modelar los osciladores circadianos utilizamos osciladores cuya dinámica periódica puede ser descrita por una sola variable, su fase ϕ . A cada oscilador se le caracteriza por una variable de fase ϕ , que varía como $\phi(t) = \omega t + \phi(0)$, donde ω es la frecuencia natural del oscilador. Cuando alcanza el valor 2π , la fase se resetea a 0. Al acoplar un conjunto de osciladores de fase, se obtiene un modelo fenomenológico de sistemas complejos en cuya evolución aparecen fenómenos de sincronización. Estos modelos han sido estudiados extensamente, con aplicaciones a sistemas físicos, tecnológicos y biológicos [87, 89–93].

Uno de los modelos de osciladores de fase más estudiados es el propuesto por Yoshiki Kuramoto [89] en 1975, en el cual los osciladores son idénticos. El acoplamiento global está dado por una función periódica de la diferencia de las fases de los osciladores acoplados. La dinámica de cada oscilador evoluciona de la siguiente forma:

$$\frac{d\phi_i}{dt} = \omega_i + \frac{k}{N} \sum_{j=1}^N \sin(\phi_j - \phi_i), \quad (3.2)$$

donde $i = 1, \dots, N$, ω_i es la frecuencia natural del oscilador i , k es la intensidad de acoplamiento y N es el número de osciladores. Se puede ver que el modelo de Kuramoto es la formulación matemática moderna del fenómeno observado por Huygens, donde

los osciladores intercambian energía por una fuerza de interacción.

La ecuación 3.2 es una ecuación de campo medio del sistema: vemos que la dinámica individual está acoplada al campo medio de la población. Si el campo medio es nulo (incoherencia), entonces cada oscilador evoluciona como si no hubiese acoplamiento, y sigue su frecuencia natural. Por otro lado, si el campo medio es distinto de cero, el comportamiento es menos trivial.

En el caso que todos los osciladores tengan la misma frecuencia natural y el acoplamiento sea positivo, el sistema alcanza el estado de sincronización total. Esto se muestra con un ejemplo en la Figura 3.7, donde se puede observar la evolución temporal de las fases de 100 osciladores con frecuencias naturales idénticas.

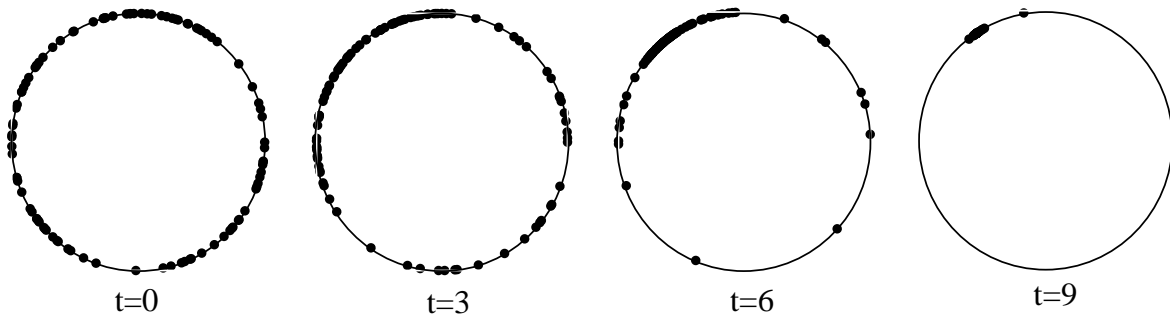


Figura 3.7: Instantáneas de la evolución temporal de las fases de 100 osciladores. Los 100 osciladores tienen frecuencias naturales $\omega_i=0$ y distribución homogénea de fases. La intensidad del acoplamiento es $k = 1$. Notar como para tiempos mas largos los osciladores se sincronizan en fase.

Sin embargo, es más habitual encontrar en la naturaleza osciladores con cierto grado de diversidad en sus propiedades individuales. Consideramos grupos de osciladores cuyas frecuencias naturales están dadas por una distribución $g(\omega)$.

Medidas de sincronización

Como resultado de las interacciones entre los distintos osciladores, la frecuencia $\dot{\phi}_i$ suele diferir de su frecuencia natural ω_i . Es por esto que se define la frecuencia efectiva Ω_i que se calcula como el promedio de $\dot{\phi}_i$ sobre tiempos largos,

$$\Omega_i = \frac{1}{T} \int_t^{t+T} \dot{\phi}_i(t') dt' \quad (3.3)$$

A un valor crítico del acoplamiento, aparecen grupos de osciladores sincronizados en la misma frecuencia efectiva, como se ve en la Figura 3.8. El número de elementos en el cluster sincronizado aumenta conforme la intensidad del acoplamiento es mayor. A partir de cierto valor crítico del acoplamiento, el número de osciladores comienza a crecer rápidamente. El valor de la frecuencia de sincronización y del acoplamiento crítico depende de la distribución de frecuencias elegida. Si la distribución es simétrica alrededor de una frecuencia ω_0 , luego la frecuencia de sincronización es justamente ω_0 . También puede mostrarse que el acoplamiento crítico está dado por

$$k_c = \frac{2}{\pi g(\omega_0)} \quad (3.4)$$

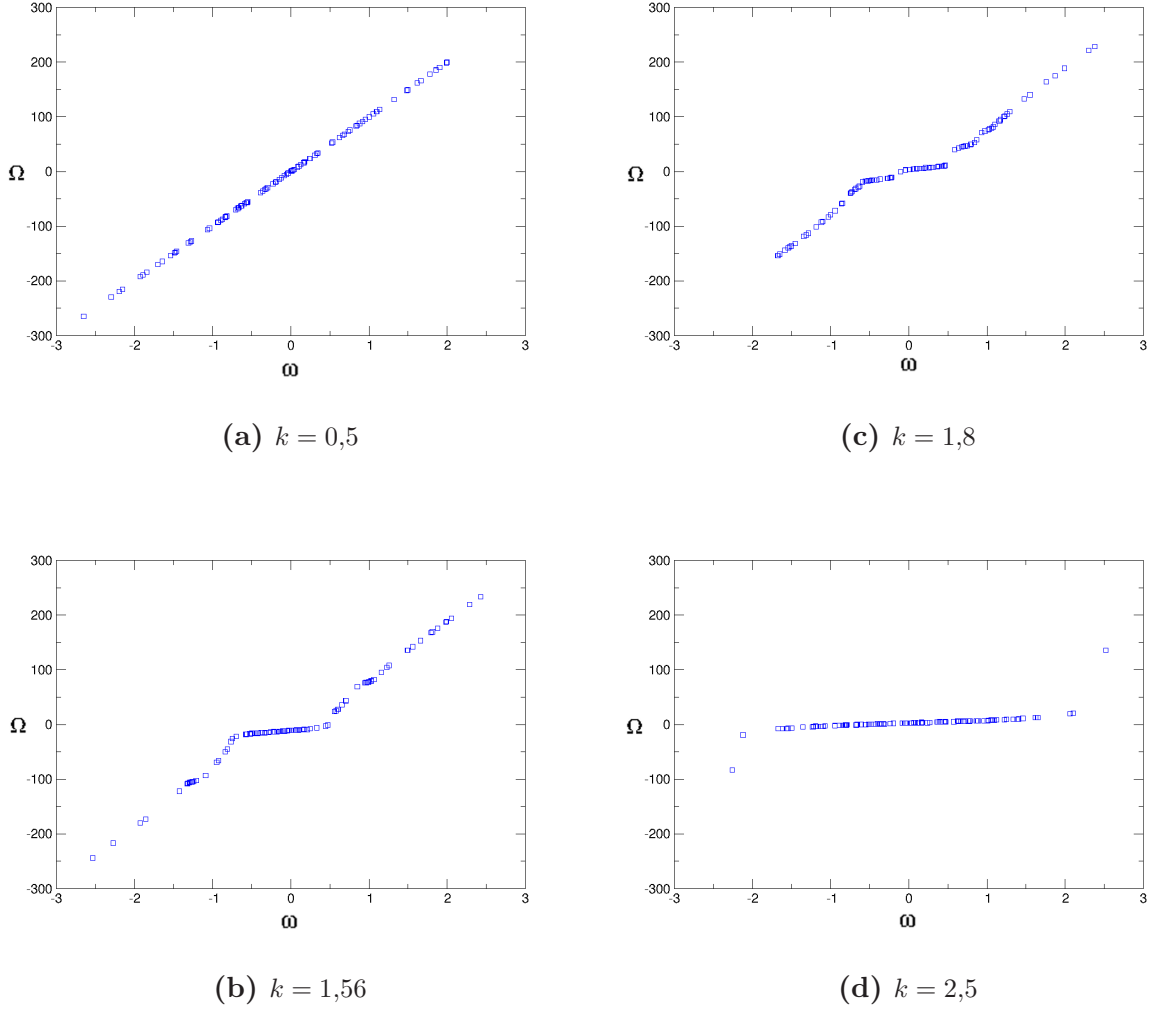


Figura 3.8: Frecuencias efectivas Ω en función de las frecuencias naturales ω para cuatro acoplamientos. Los osciladores comienzan a sincronizarse alrededor de $\omega = 0$. Al incrementar el acoplamiento k este cluster de osciladores sincronizados crece y se ve como una línea horizontal.

Para cuantificar la sincronización del sistema utilizamos el parámetro de orden de Kuramoto

$$\sigma e^{i\Phi} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N e^{i\phi_j}, \quad (3.5)$$

donde $\Phi(t)$ es la fase media. $\sigma(t)$ da una medida de la coherencia de los osciladores ($0 \leq \sigma \leq 1$). En la Figura 3.9 se muestra la solución de la ecuación 3.5 para tres grupos de osciladores acoplados de distinto tamaño en función del acoplamiento. Se observa la transición de fase cerca del valor crítico de k , la cual es más abrupta para sistemas más

grandes. Para un sistema infinito se observa una transición continua de segundo orden. Como la distribución elegida es $g(\omega) = \exp(-\omega^2/2)/\sqrt{2\pi}$, la transición está cerca a $k_c \approx 1,56$.

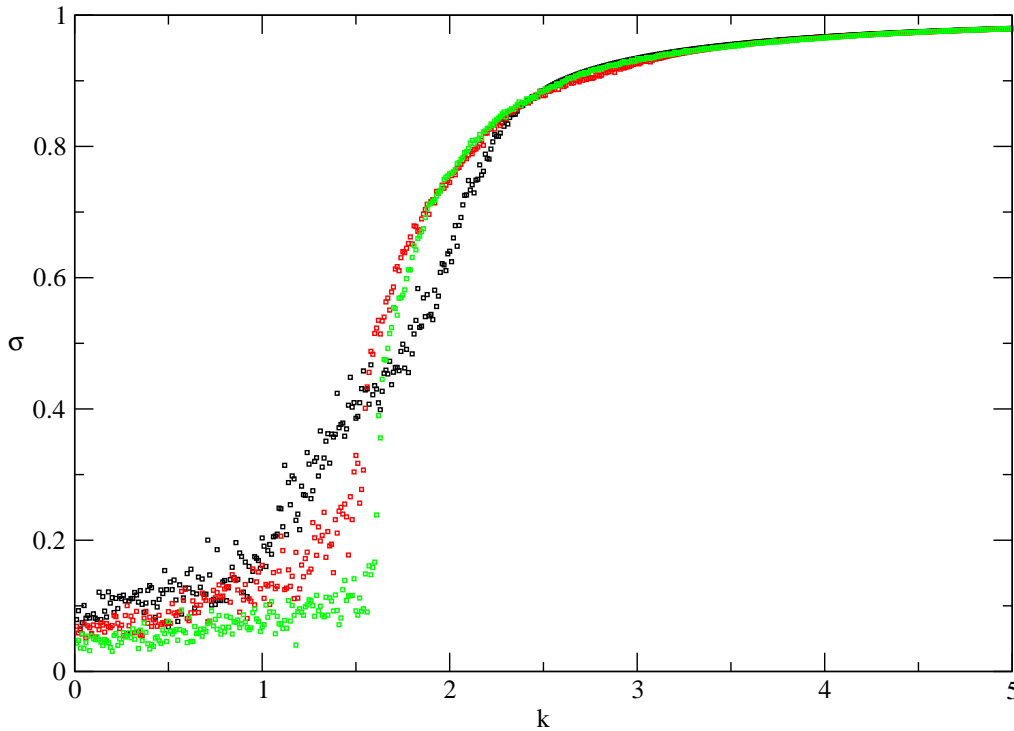


Figura 3.9: Parámetro de orden σ en función de la intensidad de acoplamiento k . Se presenta el parámetro de orden para tres ensambles de osciladores: $N = 100$ (negro), 200 (rojo) y 400 (verde) con distribución Gaussiana en sus frecuencias naturales. La transición en la sincronización ocurre a $k_c \approx 1,596$.

Una vez que se supera el k_c , aparece el cluster de osciladores sincronizados que vimos en la Figura 3.8. Cuando la distribución $g(\omega)$ tiene más de un máximo, pueden formarse más clusters. Si los máximos están bien separados, una vez formados los clusters estos se comportan como osciladores únicos, interactuando con los demás clusters [94, 95].

3.3.4. Modelos de sincronización en mamíferos

En ratones, la presencia de luz constante (LL) induce la pérdida de ritmicidad en la actividad locomotora. En el caso de los hámsters, el efecto de LL es más complejo, ya que lleva a una partición en el ritmo de actividad locomotora en dos componentes separadas por 12 horas, fenómeno conocido como “splitting”. Es decir, en lugar de tener la mayor actividad concentrada sólo durante la noche, pasan a tener dos momentos

de actividad separados por 12 horas. Estas componentes en general permanecen manteniendo una relación de fase estable, pero pueden cambiar el estado de acoplamiento y volver a manifestar un ritmo único [96].

A partir de estas observaciones que Pittendrigh y Daan hicieron estudiando los ritmos circadianos en el hámster, fue desarrollado un modelo conceptual [96]. Propusieron que el reloj del hámster está compuesto por dos osciladores mutuamente acoplados, uno al que denominaron “morning” (M), que es acelerado por la luz y sincroniza con el amanecer, y otro denominado “evening” (E), cuya frecuencia disminuye por la luz y sincroniza con el crepúsculo [97]. Además, la relación de fase determinada por el acoplamiento entre ambos puede ser modificada por la historia previa de iluminación [98]. Hay evidencias experimentales a favor y en contra de este modelo [97]. Por ejemplo, en un experimento se encontró evidencia que apoya que los osciladores del shell y del core funcionarían como dos redes separadas constituyendo los osciladores E y M [99]. Sin embargo, hay muchas neuronas reloj que no pueden ser identificadas ni como M ni como E [100].

Al estudiar los ritmos circadianos desde una perspectiva física, los modelos existentes se basan en un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas que describen oscilaciones. Estas ecuaciones pueden describir desde sencillas oscilaciones de fase a los mecanismos de retroalimentación negativa caracterizados por todas las proteínas que intervienen. Como veremos cuando introduzcamos el modelo en la próxima sección, en este trabajo utilizaremos el mecanismo más sencillo posible, teniendo como variables solo la fase y la frecuencia de las oscilaciones. Consideraremos dos grupos de osciladores circadianos que interactúan. Cambiando las propiedades del acoplamiento entre los dos grupos de N osciladores, hallaremos comportamientos cualitativamente similares a algunos resultados experimentales.

3.4. El modelo

Para modelar las dos poblaciones en el NSQ, utilizamos dos grupos de osciladores de fase. La ruta a la sincronización de dos ensambles de osciladores acoplados fue por primera vez estudiada en [101], donde Okuda y Kuramoto consideraron poblaciones acopladas de osciladores de fase idénticos en caso de ruido. A este mismo modelo se lo utilizó para estudiar la sincronización en caso de asimetría en el acoplamiento entre grupos [102, 103], considerando diferentes distribuciones de frecuencia [104], para describir estados de quimeras [105] y como aplicación al estudio de epilepsia [94]. Nosotros nos interesamos en el rol de las interacciones en las propiedades de sincronización del modelo. En particular, consideramos los efectos de distribuciones asimétricas, sistemas de tamaño finito y retardos temporales. Estos ingredientes limitan fuertemente el análisis analítico [106], por lo que nos enfocamos en las simulaciones numéricas.

El sistema está formado por dos tipos de osciladores con frecuencias $\omega_i^{(1)}$ y $\omega_j^{(2)}$, los cuales están acoplados con acoplamiento intragrupos k_i ($i = 1, 2$) y acoplamiento intergrupos k en una dirección y qk en la otra. τ es el retardo temporal entre grupos. El esquema del modelo se muestra en la Figura 3.10. Cuando $k = 0$, los dos grupos están desacoplados, con lo que las propiedades de sincronización de cada grupo son independientes de las del otro, y sólo dependen de los acoplamientos intragrupos k_1 y k_2 . La asimetría en el acoplamiento permite un cambio de roles entre grupos, ya que cambiando el valor del parámetro q podemos analizar como un grupo tiene influencia sobre el otro. El acoplamiento está modelado como campo medio y la interacción es global (todos con todos). Las ecuaciones para la dinámica de la fase de cada oscilador son:

$$\frac{d\phi_i^{(1)}}{dt} = \omega_i^{(1)} + \frac{k_1}{N_1} \sum_{j=1}^{N_1} \sin(\phi_j^{(1)}(t) - \phi_i^{(1)}(t)) + \frac{qk}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \sin(\phi_j^{(2)}(t - \tau) - \phi_i^{(1)}(t)) \quad (3.6)$$

$$\frac{d\phi_i^{(2)}}{dt} = \omega_i^{(2)} + \frac{k_2}{N_2} \sum_{j=1}^{N_2} \sin(\phi_j^{(2)}(t) - \phi_i^{(2)}(t)) + \frac{k}{N_1} \sum_{j=1}^{N_1} \sin(\phi_j^{(1)}(t - \tau) - \phi_i^{(2)}(t)) \quad (3.7)$$

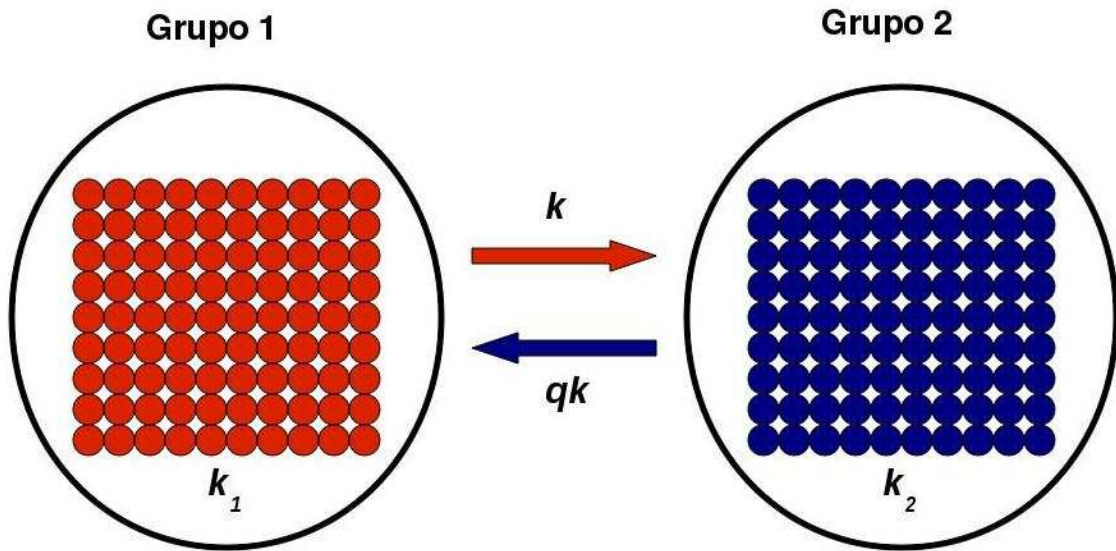


Figura 3.10: Esquema del modelo teórico. Dos grupos de osciladores conectados todos con todos con acoplamiento entre grupos k en una dirección y qk en la otra. Cada grupo tiene acoplamiento interno k_1 y k_2 respectivamente.

Utilizamos una distribución Gaussiana de frecuencias naturales

$$g(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp \frac{-(\omega - \omega_0)^2}{2\sigma^2}, \quad (3.8)$$

donde cada grupo tiene un valor medio distinto $\omega_0^{(1)}$ y $\omega_0^{(2)}$. El modelo permite análisis analítico, y se puede mostrar que el acoplamiento crítico para cada grupo es $k_c = 2/[\pi g(\omega_0)]$ [87, 89, 91–93].

Para caracterizar la sincronización de fase global usamos el parámetro de orden S [94]:

$$S = \frac{1}{T} \int_{T_0}^{T_0+T} \left| \frac{r_1 e^{i\Phi_1} + r_2 e^{i(\Phi_2+\Phi^*)}}{2} \right| dt \quad (3.9)$$

donde r_1 y r_2 son los parámetros de orden de cada grupo y Φ^* es la diferencia de fase más probable en un período de tiempo T , que puede ser medida del máximo de la distribución de probabilidad de la diferencia de fase $\Delta\Phi(t) = \text{mod}(\Phi_1(t) - \Phi_2(t), 2\pi)$ [107]. Cuando ambos grupos están sincronizados en fase, S es el promedio de r_1 y r_2 , pero cuando no hay sincronización de fase entre los subsistemas se espera que S tenga un valor bajo.

Las poblaciones interactuantes de osciladores de Kuramoto han sido estudiadas intensamente en varios trabajos recientes. En particular, el ansatz de Ott-Antonsen [108] para osciladores de Kuramoto con distribución de frecuencias Lorentziana ha facilitado el análisis teórico de este tipo de modelos. Utilizando este ansatz, en [106], fue hecho el análisis de bifurcaciones para este sistema en el límite N infinito.

3.5. Resultados

En esta sección mostraremos los resultados que obtuvimos al estudiar la sincronización entre dos grupos de osciladores de Kuramoto con interacción global. Utilizando simulaciones numéricas analizamos cómo la intensidad en el acoplamiento de cada grupo y entre grupos afecta la sincronización local y global.

En búsqueda de la formación de clusters localmente sincronizados, en primer lugar analizamos la frecuencia media de cada grupo. En la fila de arriba de la Figura 3.11 graficamos la frecuencia media Ω como función de la frecuencia natural ω para los osciladores del grupo 1 (azul) y 2 (rojo) para cuatro valores diferentes de acoplamiento entre grupos. La figura muestra claramente la presencia de clusters sincronizados, que aparecen como líneas horizontales. Estos son osciladores con frecuencias naturales distintas que ahora todos tienen la misma frecuencia media. Ambos grupos poseen un acoplamiento interno mayor al valor crítico, por lo que, como era esperado, aparece un cluster sincronizado con frecuencia media $\Omega_{(1,2)}$, centrado en el valor medio de la distribución $\omega_0^{(1,2)}$. Incluso para valores bajos del acoplamiento entre grupos, algunos osciladores del grupo 1 sincronizan sus frecuencias con la frecuencia media $\omega_0^{(2)}$. Esto puede observarse como un pequeño cluster azul en medio de la línea horizontal roja en el primer panel, cuando $k = 0,05$. Los primeros osciladores en sincronizarse son aquellos cuyas frecuencias naturales son cercanas a Ω_2 . A medida que el acoplamiento entre grupos aumenta, más osciladores del grupo 1 aparecen en el cluster principal. Este efec-

to puede ser revertido cambiando el valor del parámetro q . Por ejemplo, para $q = 0,5$ los resultados son cualitativamente similares, pero en este caso son los osciladores del grupo 2 los que saltan al cluster centrado en la frecuencia Ω_1 .

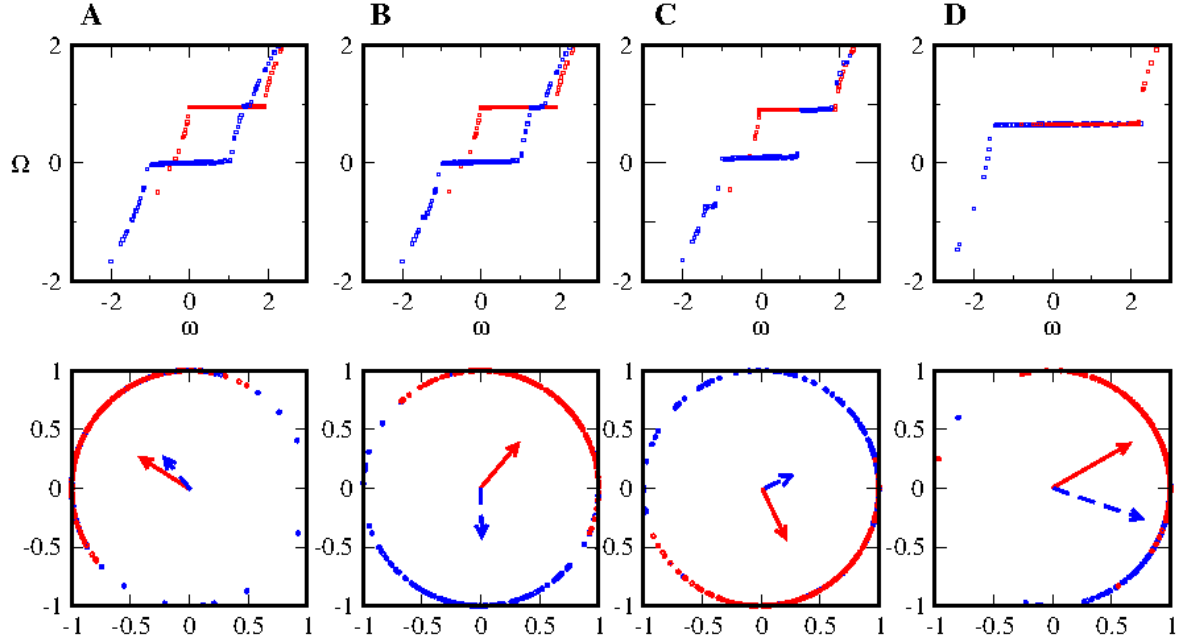


Figura 3.11: Sincronización de fase. (Panel superior) Frecuencia media Ω_i como función de las frecuencias naturales ω_i para los osciladores del grupo 1 (azul) y 2 (rojo) para cuatro valores distintos del acoplamiento entre grupos: A) $k = 0,05$, B) $k = 0,1$, C) $k = 0,2$, D) $k = 0,5$. Los osciladores sincronizados aparecen como líneas horizontales. (Panel inferior) Instantáneas de las fases de los clusters sincronizados. Los vectores muestran el valor del parámetro de orden para cada grupo. Todas las figuras corresponden a los valores de los parámetros $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,4$, $q = 2$, $\sigma_1 = 1$, $\sigma_2 = 0,5$, y $\Delta\omega = \omega_0^{(2)} - \omega_0^{(1)} = 1$.

Un efecto interesante puede ser observado para $k = 0,2$ en la Figura 3.11 (C), donde se observa un fenómeno de “resonancia”. Un pequeño cluster de osciladores aparece cerca de $\Omega = -0,5$. La formación de clusters con diferentes frecuencias promedio es usual en sistemas conectados localmente o con estructura de red [92, 107]. Sin embargo, también aparecen en sistemas totalmente conectados aunque no haya heterogeneidades en la estructura de red, si las hay en la intensidad del acoplamiento [109–111]. Este tipo de clusters han sido observados experimentalmente en grupos de osciladores con interacciones químicas que fueron descritos como osciladores de fase de Kuramoto con distribución de frecuencias con varios picos por Kiss *et al.* [94, 95]. Es importante resaltar la formación de estas estructuras a pesar de que sea un modelo de campo medio. Desde un punto de vista biológico, estas estructuras podrían ser necesarias para permitir la aparición de diferentes jerarquías cambiando el acoplamiento. De hecho, como ya mencionamos, ha sido observado que el acoplamiento entre las neuronas del NSQ juega un rol importante para asegurar oscilaciones circadianas robustas pero flexibles [112]. A medida que el acoplamiento entre grupos se hace más fuerte, los osciladores de ambos grupos se sincronizan en la misma frecuencia media, y finalmente un único

cluster formado tanto por osciladores del grupo 1 como del grupo 2 es observado.

En el panel inferior de la Figura 3.11 presentamos “fotos” de las fases de los osciladores distribuidas en el círculo unidad. Para mayor claridad sólo presentamos las fases de los osciladores que pertenecen al cluster principal. También presentamos el parámetro de orden de Kuramoto como un vector para cada grupo. El largo de la flecha representa el grado de sincronización de fase, y la dirección apunta hacia la fase media. Para poder comparar las cuatro instantáneas utilizamos las mismas condiciones iniciales. Para $k = 0,05$ la sincronización de fase del grupo 2 es mucho más grande que la del grupo 1. Eventualmente ambos grupos se sincronizan con la misma frecuencia y ambos parámetros de orden crecen, mostrando como era esperado que la sincronización entre grupos ocurre. Este fenómeno se debe a la asimetría entre clusters introducida por el parámetro q . Se puede ver como los osciladores no sincronizados tanto del grupo 1 como del 2 más cercanos al grupo sincronizado del grupo 2, se terminan uniendo a este cluster con Ω_2 . A medida que el acoplamiento es más intenso, más osciladores se sincronizan en este cluster. Además, la frecuencia promedio final Ω no coincide exactamente con Ω_2 ya que aún quedan osciladores no sincronizados que modifican la frecuencia efectiva.

Para poder caracterizar cuantitativamente la sincronización de fase global, en la Figura 3.12 mostramos el comportamiento de S como función del acoplamiento entre grupos k . Encontramos que S presenta un comportamiento no monótono. Para $k = 0$ el parámetro de orden tiene un valor alto $S \approx 0,6$, el cual es esperado ya que ambos grupos poseen un acoplamiento interno por encima del valor crítico k_c y ya se pueden observar clusters sincronizados de cada grupo. Para un acoplamiento entre grupos bajo ($k < 0,1$) el efecto en la sincronización global es pequeño, aunque ya se puede observar un decaimiento en S . A medida que k aumenta más, S decrece, alcanzando un mínimo para $k \approx 0,2$, y luego aumenta monotonamente con k .

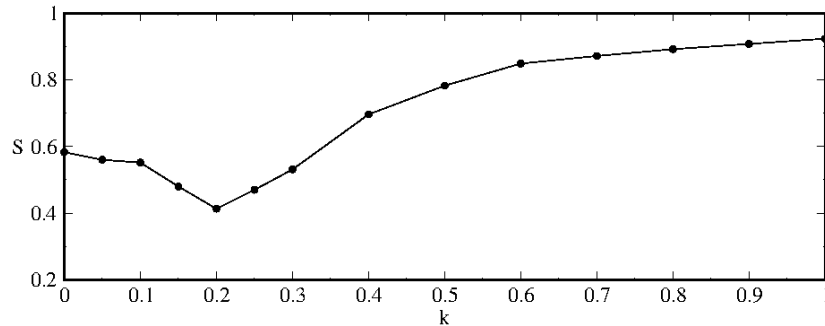


Figura 3.12: El parámetro de orden de sincronización global S como función del acoplamiento entre grupos k . S tiene un comportamiento no monótono con k . La figura corresponde a los parámetros $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,4$, $q = 2$, $\sigma_1 = 1$, $\sigma_2 = 0,5$, y $\Delta\omega = 1$.

El comportamiento no monótono del parámetro de orden de fase (Ecuación (3.5)) ya ha sido observado en el modelo de Kuramoto cuando las frecuencias naturales son

distribuidas en forma aleatoria en redes con estructura diluida, como redes libres de escala [113]. Este efecto se debe a la sincronización para acoplamientos bajos entre osciladores vecinos con frecuencias naturales similares. A medida que el acoplamiento aumenta estos grupos localmente sincronizados interactúan y comienzan a sincronizarse entre ellos, llevando al parámetro de orden a valores más altos.

En nuestro modelo el sistema está totalmente acoplado, y el comportamiento no monótono emerge de la competencia entre clusters sincronizados del grupo 1 y 2. Como ya se mencionó, cuando $k \approx 0,2$ los osciladores del grupo 1 pasan al cluster del grupo 2, llevando a un decrecimiento del parámetro de orden del grupo 1. Esto afecta la sincronización global, hasta que el tamaño del cluster principal se vuelve lo suficientemente grande.

Ahora vamos a enfocar nuestra atención en el ancho de la distribución de frecuencias naturales de cada grupo. Se espera que este tenga una relación directa con el tamaño de los clusters sincronizados, ya que modifica el valor del acoplamiento crítico. Hasta ahora todos los resultados presentados son para desviación estandar de la distribución Gaussiana del grupo 1 igual a $\sigma_1 = 1,0$, mientras que para el grupo 2 era $\sigma_2 = 0,5$, con lo que el valor crítico del acoplamiento era $k_c^{(1)} \approx 1,59$ y $k_c^{(2)} \approx 0,79$. Vamos a analizar los efectos de modificar σ_2 manteniendo la desviación estandar del grupo 1 fija en $\sigma_1 = 1,0$. En la Figura 3.13 graficamos S vs k para: (A) $\sigma_2 = 0,5$ y $k_2 \gg k_c^{(2)}$, (B) $\sigma_2 = 1,0$ y $k_2 > k_c^{(2)}$ y (C) $\sigma_2 = 2,0$ y $k_2 < k_c^{(2)}$. Para tener una mejor noción también mostramos cualitativamente la forma de las distribuciones (en negro el grupo con σ_1 y en rojo el grupo con σ_2). Los otros parámetros están fijos y son $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,8$, $q = 2$ y $\Delta\omega = 1$.

Cuando el acoplamiento interno del grupo 2 es mucho mayor que $k_c^{(2)}$, como en la Figura 3.13 (A), el comportamiento no monótono es más agudo. Además, se observa que $S_{min}^A > S_{min}^B$. A medida que σ_2 aumenta el comportamiento no monótono se suaviza, y la Figura 3.13 (C) muestra que para $\sigma_2 = 2,0$ el parámetro de orden S tiene comportamiento monótono. En este caso, para $k = 0$, el valor de S mucho mas bajo que el observado en la Figura 3.13(A). Esto se debe a que como es tan grande la desviación estandar σ_2 no permite la formación de clusters sincronizados para el mismo acoplamiento interno $k_2 = 1,8$.

Estudiamos el rol del acoplamiento interno de cada grupo teniendo en cuenta la heterogeneidad de la distribución de frecuencias naturales de los dos grupos. En la Figura 3.14 graficamos el parámetro de orden S como función del acoplamiento entre grupos k para cuatro valores de k_2 con $\sigma_1 = \sigma_2 = 1,0$. Si $k_2 \leq k_c$ (primera columna), S crece monótonamente. En ese caso, la sincronización en el grupo 1 es lo suficientemente fuerte para no ser influenciada por el grupo 2, por lo que no hay competencia entre clusters sincronizados. Si $k_2 > k_c^{(2)}$, el comportamiento no monótono comienza a aparecer. Notar que para $k = 0$, el valor de S aumenta cuando la intensidad de k_2 mayor.

Este fenómeno es consecuencia de que la distribución de frecuencias ancha dificulta la sincronización entre grupos.

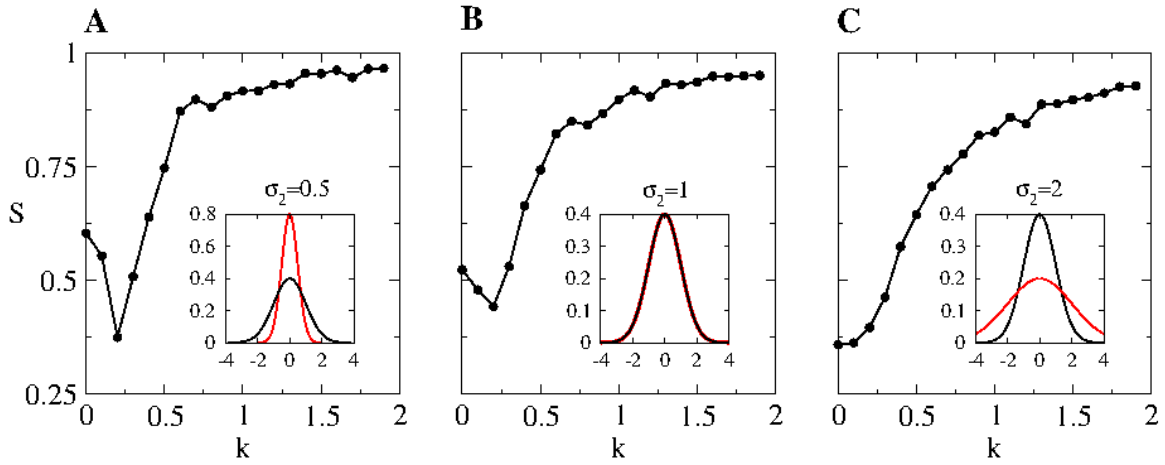


Figura 3.13: S vs k para distintos σ_2 . Parámetro de orden global S vs acoplamiento interno k para tres valores de la desviación estándar de la distribución Gaussiana de frecuencias naturales del grupo 2: (A) $\sigma_2 = 0,5$, (B) $\sigma_2 = 1,0$, (C) $\sigma_2 = 2,0$. En el grupo 1 $\sigma_1 = 1,0$ está fijo. La figura corresponde a $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,8$, $q = 2$, y $\Delta\omega = 1$. A medida que el acoplamiento interno es mayor que el acoplamiento crítico, el mínimo del parámetro de orden es más agudo.

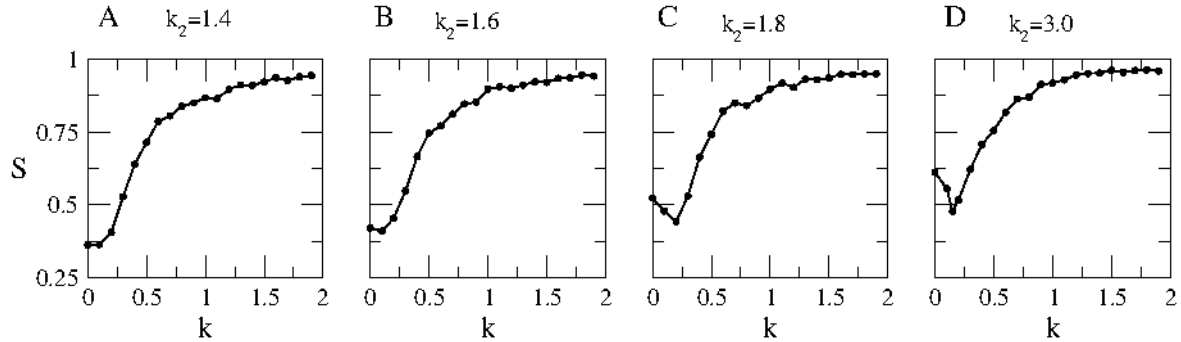


Figura 3.14: S vs k para distintos k_2 . El parámetro de orden global S en función del acoplamiento entre grupos k para cuatro valores del acoplamiento interno del grupo 2, (A) $k_2 = 1,4$, (B) $k_2 = 1,6$, (C) $k_2 = 1,8$ y (D) $k_2 = 3,0$. Todas las figuras corresponden a los valores $\sigma_1 = 1$, $k_1 = 1,8$, $q = 2$, $\Delta\omega = 1$ y 100 simulaciones independientes. Notar que el comportamiento no monótono aparece para acoplamientos del grupo 2 por encima de su valor crítico.

También analizamos el efecto de modificar el tamaño de uno de los grupos dejando fijo el tamaño del otro. En la Figura 3.15 mostramos los resultados cuando el tamaño del grupo 2 está fijado en $N_2 = 200$ osciladores y el tamaño del grupo 1 toma los siguientes valores: (A) $N_1 = 40$, (B) $N_1 = 80$ y (C) $N_1 = 160$. Graficamos la frecuencia media como función de la frecuencia natural ω para cada oscilador. Se observa el mismo comportamiento cualitativo para los tres casos. Para acoplamiento muy pequeño k aparecen dos clusters sincronizados. A medida que k se hace más grande los osciladores en el grupo 1 se mueven al cluster principal formado mayormente por osciladores del grupo 2. Para acoplamiento k lo suficientemente grande todos los osciladores se sincronizan en el mismo cluster.

En la Figura 3.16 mostramos la evolución temporal de la fase de 15 osciladores pertenecientes a los clusters sincronizados observados en la Figura 3.15. La figura muestra como la relación de fase entre los grupos puede ser modulada manteniendo el acoplamiento entre los grupos pero cambiando el número de osciladores. Se han hecho observaciones experimentales que sugieren que subpoblaciones de células dentro del NSQ muestran distintas relaciones de fase cuya función podría ser dar plasticidad para la adaptación a distintos fotoperíodos [114].

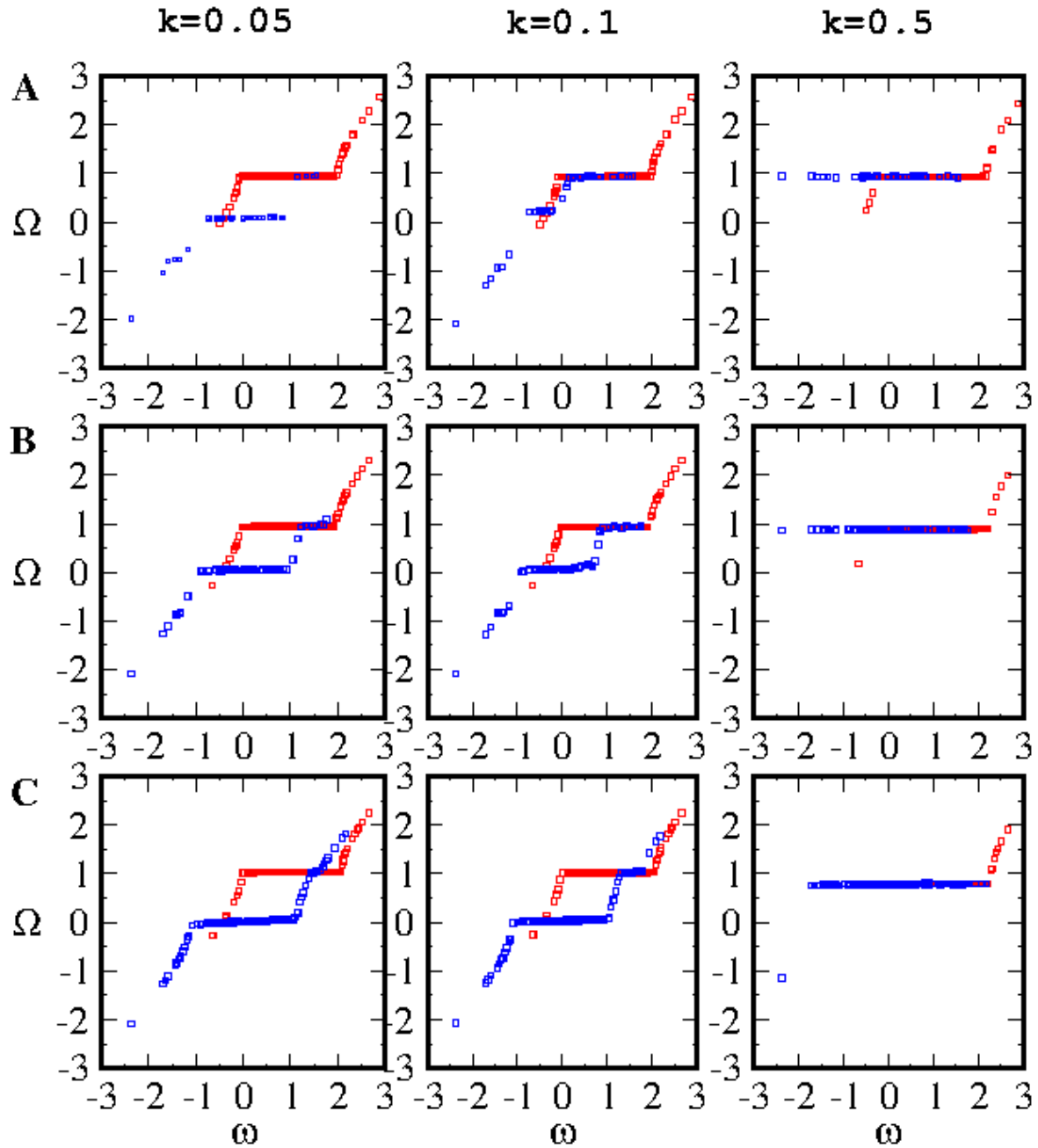


Figura 3.15: Ω vs ω . Frecuencia promedio Ω como función de la frecuencia natural ω para tres tamaños del grupo 1 y tres intensidades del acoplamiento: (A) $N_1 = 40$, (B) $N_1 = 80$ y (C) $N_1 = 160$. El tamaño del grupo 2 es en todos los casos de $N_2 = 200$. Las figuras corresponden a $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,4$, $q = 2$ y $\Delta\omega = 1$. Observar que en los tres casos las frecuencias de los clusters sincronizados son similares.

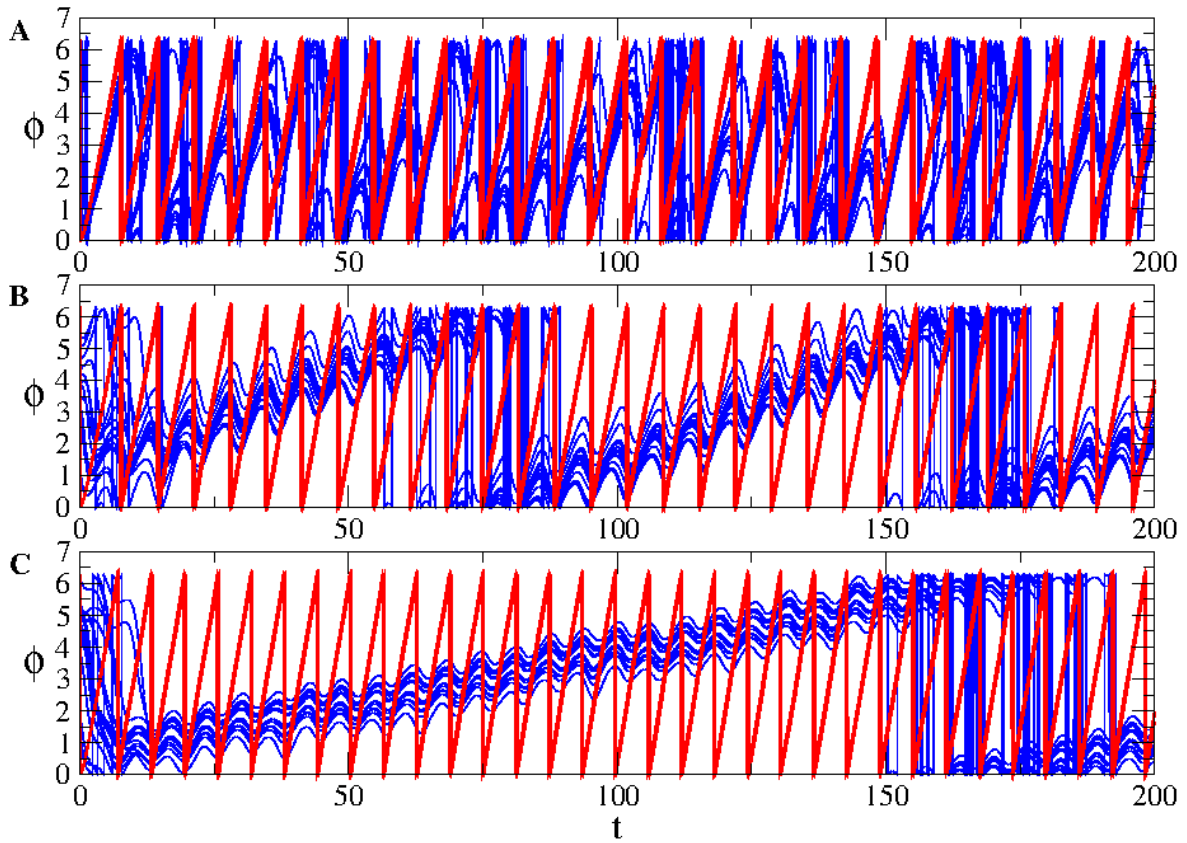


Figura 3.16: Evolución temporal de la fase. Evolución temporal de la fase de 15 osciladores en cada uno de los clusters observados en la Figura 3.15, para (A) $N_1 = 40$ (B) $N_1 = 80$ (C) $N_1 = 160$ cuando $k = 0,1$. Se observa que la relación de fase entre grupos cambia al modificar el número de osciladores del grupo 1.

Como ya mencionamos, ha sido observado que los dos hemisferios del NSQ pueden disociar su actividad y oscilar en antifase [115]. Li *et al.* [116] mostró que los retardos temporales son un factor clave para obtener patrones de oscilación en antifase. Hasta ahora consideramos el modelo sin retardo temporal, por lo que vamos a ver que cambia cuando $\tau \neq 0$. En la Figura 3.17 mostramos que podemos obtener patrones antifase cambiando el retardo temporal entre grupos. Cuando no hay delay, ambos grupos oscilan en fase, pero al incrementar τ obtenemos comportamiento antifase con los mismos parámetros y condiciones iniciales.

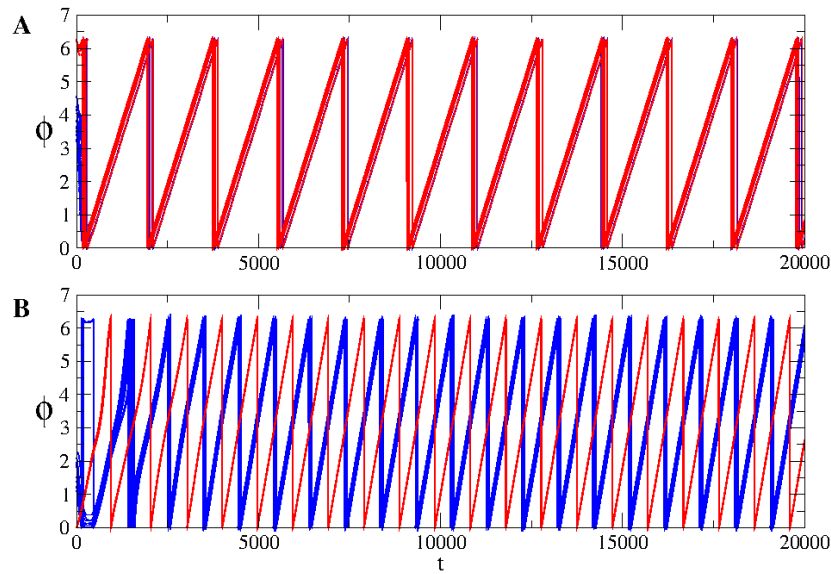


Figura 3.17: Evolución de la fase de 10 osciladores en el cluster principal. Todos los sistemas inician con las mismas condiciones iniciales pero delay diferentes: (A) $\tau = 0$ y (B) $\tau = 4$. Cuando no hay delay, ambos grupos se sintonizan en fase y frecuencia, pero cuando $\tau = 4$ aparece el comportamiento antifase. Los valores de los parámetros son $k_1 = 1,8$, $k_2 = 1,4$, $q = 2$, $\sigma_1 = 1,0$, $\sigma_2 = 0,5$, $\Delta\omega = 1$.

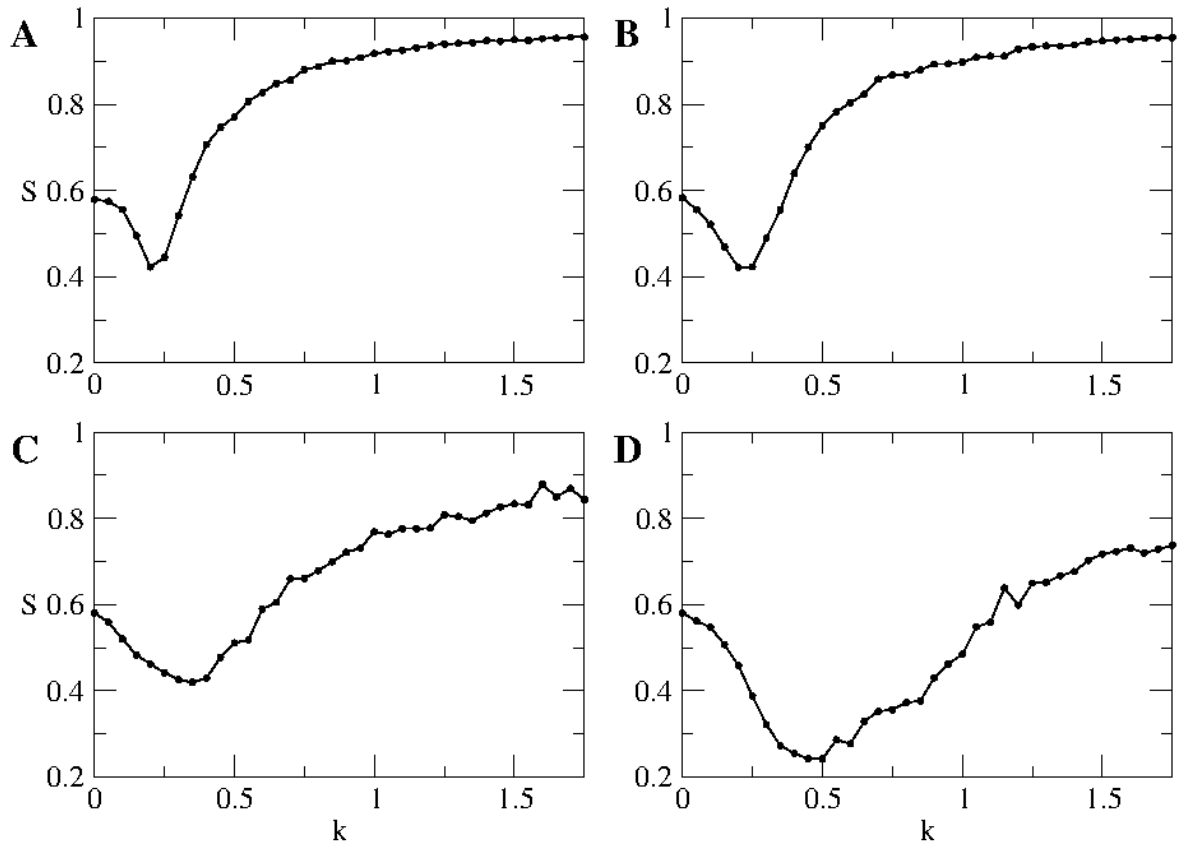


Figura 3.18: S vs k para distintos retardos. (A) $\tau = 0$, (B) $\tau = 2$, (C) $\tau = 4$ y (D) $\tau = 6$. Para retardos temporales más grandes, el comportamiento no monótono es menos agudo. Los parámetros son los mismos que en la Figura 3.17.

También analizamos el efecto del retardo temporal en la sincronización global de

fase. En la Figura 3.18 mostramos el parámetro de orden S como función del acoplamiento entre grupos k para cuatro valores del retardo temporal τ y 500 simulaciones independientes. En el caso de $\tau = 0$ el comportamiento no monótono puede ser observado. Sin embargo, la presencia de delay es perjudicial para la sincronización global. A medida que τ aumenta, el mínimo del parámetro de orden decrece y para mayores valores de acoplamiento S toma valores más pequeños. Además, para retardos largos, el sistema presenta mayores fluctuaciones, que se reflejan en el valor del parámetro de orden.

La Figura 3.19 muestra las regiones de sincronización global para valores diferentes de retardos temporales cuando $k = 0,5$. Encontramos que la región de sincronización global se reduce al aumentar el valor de τ . En (A), casi para cualquier acoplamiento interno el sistema alcanza un valor del parámetro de orden alto, incluyendo valores por debajo y por encima del acoplamiento interno crítico. Observar que cuando el retardo temporal aumenta, por ejemplo en (D), la región de sincronización está limitada a valores del acoplamiento interno del grupo 2 por debajo del valor crítico ($k_c^{(2)} \approx 0,79$).

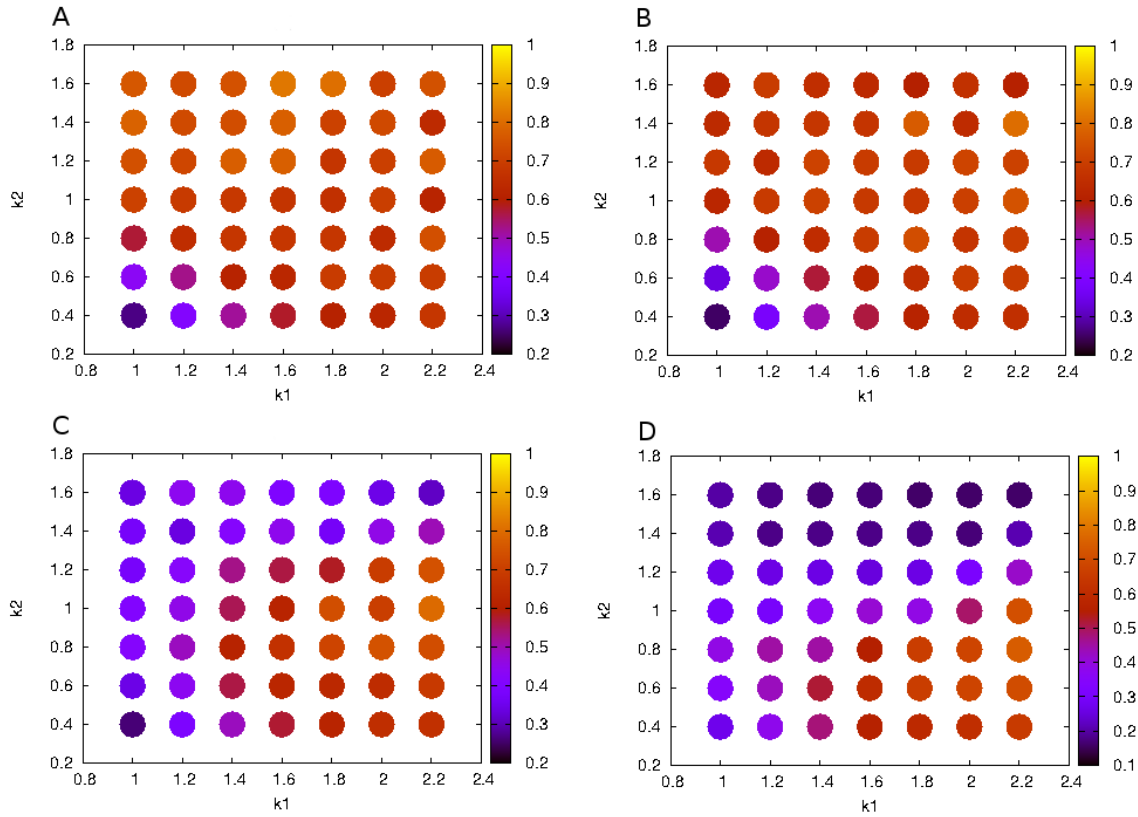


Figura 3.19: Diagramas k_1 - k_2 para distintos retardos. El color indica el valor del parámetro de orden S para: (A) $\tau = 0$, (B) $\tau = 2$, (C) $\tau = 4$ y (D) $\tau = 6$. En estos diagramas k_1 - k_2 es posible notar como la región de mayor sincronización global cambia de tamaño de acuerdo al retardo temporal. Para delays grandes, la región de sincronización es menor y un acoplamiento muy intenso en el grupo 2 no asegura la sincronización global. Las figuras corresponden a $k = 0,5$, $q = 2$, $\sigma_1 = 1,0$, $\sigma_2 = 0,5$, $\Delta\omega = 1$.

3.6. Conclusiones

En los mamíferos, el reloj central se encuentra en el núcleo supraquiasmático dentro del hipotálamo. Este tiene 20000 neuronas y puede dividirse en dos grupos distintos, tanto anatómica como fisiológicamente, el *core* y el *shell*. Cada uno de ellos está compuesto de miles de neuronas reloj, de las cuáles se conoce mucho detalle sobre cómo oscilan a nivel molecular. Sin embargo, la interacción entre cada una de estas neuronas y la intensidad de su acoplamiento, que regula la fisiología de cada individuo y permite la emergencia de un único período circadiano para el comportamiento es aún una pregunta abierta.

Para abordar este problema tomamos el modelo más simple que se puede pensar, considerando dos grupos de osciladores de fase totalmente acoplados con una distribución Gaussiana de frecuencias naturales y analizamos sus propiedades de sincronización. A través de simulaciones numéricas estudiamos cómo las diferentes intensidades de acoplamiento afectan la sincronización local y global. Encontramos que incluso en un modelo simple como este se pueden obtener resultados antiintuitivos, ya que en algunos casos aumentar el acoplamiento entre los grupos puede disminuir la sincronización global.

Mostramos que modificando la intensidad en el acoplamiento pueden aparecer pequeños clusters de osciladores en diferentes frecuencias. Experimentalmente, se encontró que en el núcleo supraquiasmático hay un grupo de fase principal, que contiene el 50 % de las neuronas, y dos grupos más, cada uno conteniendo el 10-20 % de neuronas [100]. En este trabajo, Quintero sugiere que estos grupos surgen sólo debido a cambios en el acoplamiento, lo cuál muestra que a pesar de la simpleza del modelo se pueden recuperar propiedades de los grupos verificadas experimentalmente. Esto es importante porque aún no hay acuerdo sobre si el núcleo supraquiasmático produce una sola señal que representa el período promedio de sus osciladores o si está organizado como un ensamble de distintos grupos de osciladores cuyo acoplamiento permite una única señal. Esto se debe a las dificultades experimentales en la determinación de señales oscilatorias en diferentes regiones de los tejidos (ver 3.2.4).

Además, mostramos que la relación de fase entre clusters sincronizados puede ser modificada cambiando el número de osciladores en cada subpoblación y el retardo temporal. Experimentalmente también se había encontrado que en el caso del splitting, el lado derecho y el izquierdo del reloj maestro oscilan en antifase [115]. Esta fenomenología también puede ser explicada por el modelo de dos grupos conectados.

De esta forma, con el modelo más sencillo posible para los dos grupos de osciladores del núcleo supraquiasmático, en el que no se tienen en cuenta los aspectos moleculares de las neuronas reloj, logramos reproducir resultados hallados experimentalmente y encontramos un comportamiento antiintuitivo del fenómeno de sincronización global.

Capítulo 4

Drosophila melanogaster

Los experimentos realizados con la mosca *Drosophila melanogaster* representan el trabajo más extenso e interdisciplinario de esta tesis. En este capítulo comenzaremos contando el desarrollo, las características y funcionamiento de un dispositivo de monitoreo de actividad locomotora al que denominamos d-Tracker. Este dispositivo permite hacer un monitoreo de la actividad locomotora individual de las moscas en pistas del tamaño y forma que se desee. Luego describiremos los experimentos que realizamos registrando la actividad de distintas líneas de moscas y el análisis de los datos obtenidos. Por último, contaremos los experimentos realizados para estudiar el comportamiento de oviposición de hembras y los resultados obtenidos.

El trabajo realizado durante esta tesis formó parte de la creación del laboratorio de *Drosophila* a cargo de la Dra Lorena Franco en el Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), en la Universidad del Comahue. Las actividades desarrolladas dejan como punto de partida para futuros experimentos problemas con los que nos fuimos encontrando ya resueltos.

4.1. La mosca de la fruta

Drosophila melanogaster, también conocida popularmente como la mosca de la fruta o del vinagre, es un insecto cuyo ciclo vital consta de cuatro etapas: huevo, tres estadios larvales, pupa y adulto. El ciclo de vida comienza con el huevo, que tiene forma ovoide con dos pequeñas proyecciones que le ayudan a no hundirse en el medio de cultivo, y generalmente eclosiona transcurridas 18 a 24 h desde su puesta. Si no dispone de un sustrato de oviposición adecuado, disminuyendo así el tiempo de eclosión, las hembras pueden retener sus huevos y depositarlos más tarde en un estado de desarrollo avanzado. A continuación, el estadio larval es la etapa principal de alimentación y consta de 2 mudas totales de exoesqueleto, proceso que se conoce como ecdisis. Este proceso dura, en total, aproximadamente 4 días. Transcurrido este tiempo, la larva deja de alimentarse y entra en el estadio de pupa, en el que permanece inmovil adherida a

la pared del recipiente que la contiene. Esta etapa dura aproximadamente 3 días, al cabo de los cuales emerge una mosca adulta. Los adultos viven alrededor de 20 días en el laboratorio, aunque el tiempo de vida difiere considerablemente entre individuos y depende de las condiciones ambientales.

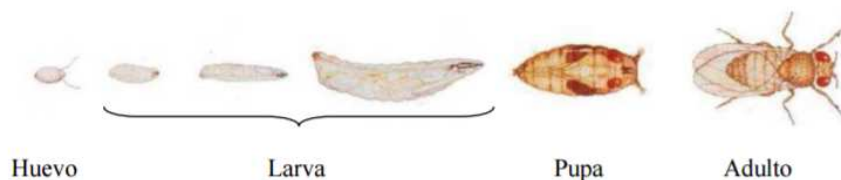


Figura 4.1: Estadios del ciclo vital de *Drosophila*. Luego de aproximadamente 10 días la mosca llega a adulta y eclosiona de la pupa.

La diferenciación entre machos y hembras puede realizarse a simple vista o con la ayuda de una lupa. Las hembras son algo más grandes que los machos y tienen el abdomen más puntiagudo. Además, en las hembras se distinguen cinco rayas en el abdomen, mientras que el macho tiene solo tres con la última más gruesa, lo que le da un color más oscuro al final de su abdomen, como se observa en la Figura 4.2. De esta característica viene su nombre, ya que recordemos que *melanogaster* en latín significa vientre negro.



Figura 4.2: Dimorfismo sexual en *Drosophila*. Esquema comparativo entre un individuo macho (izquierda) y un individuo hembra (derecha). Se puede observar la diferencia en el tamaño y la mancha negra en el abdomen de los machos.

4.2. Su relevancia circadiana

Desde el primer trabajo de Konopka y Benzer, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se convirtió en un organismo fundamental para la cronobiología [117]. En ese trabajo, identificaron tres alelos de un mismo gen que modifica tanto la ritmicidad de eclosión de las pupas a nivel poblacional como la actividad locomotora de las moscas adultas. De esa forma, hallaron los tres fenotipos básicos característicos de los ritmos circadianos: período largo, período corto y arritmicidad [29]. En la Figura 4.3 se muestran los actogramas para todos los casos. En el panel (A), se observa que la mosca tiene

actividad durante el día, con un período cercano a las 24 horas. En el panel (B), se muestra el actograma de una mosca arrítmica, por lo cual se observa actividad a toda hora. En los paneles (C) y (D), la mosca mutante mantiene su ritmicidad, pero con un período más corto o más largo, respectivamente. Estos mutantes establecieron no sólo que la ritmicidad circadiana tiene una base genética, sino que también constituyeron la primera evidencia de que mutaciones en un gen pueden modificar el comportamiento de un animal. Este, junto con otros descubrimientos, fue el ladrillo fundacional de la búsqueda de los mecanismos básicos del funcionamiento del reloj circadiano [118].

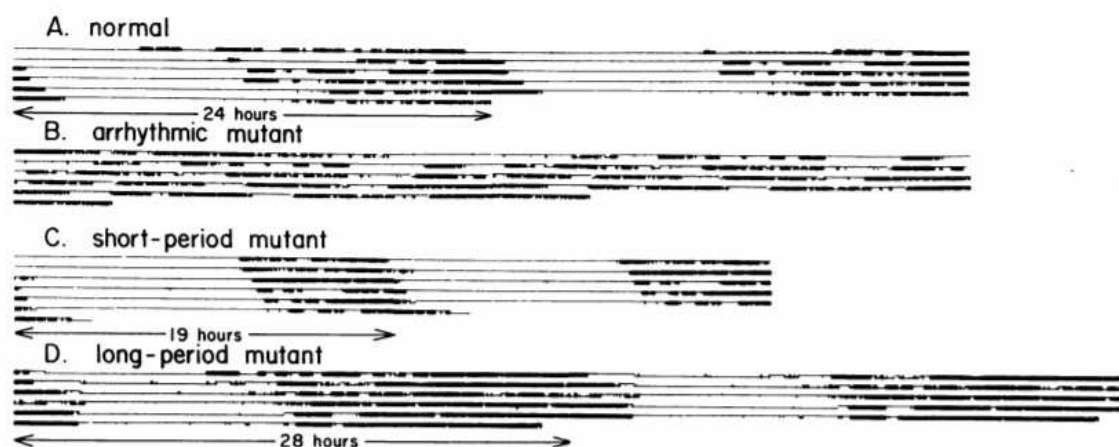


Figura 4.3: Actogramas de los primeros mutantes reloj de *Drosophila*. Actividad locomotora en ciclos de oscuridad constante para una mosca normal y los tres mutantes reloj encontrados por Konopka y Benzer. En el caso de la mosca arrítmica, la actividad locomotora parece ser azarosa, de lo que se deduce que la mutación rompió el reloj interno del individuo. Figura tomada de [29].

La identificación de otros mutantes en los años subsiguientes, de los cuales algunos ejemplos se muestran en la Tabla 4.1, permitieron caracterizar genes cuyas mutaciones inducen cambios en el fenotipo circadiano. Una vez que se caracteriza la mutación, es necesario estudiar por medio de métodos moleculares y bioquímicos cómo son los procesos en los cuales participa este gen que permiten el correcto funcionamiento del reloj molecular. Por ejemplo, el análisis de la expresión de *per* y de su promotor, identificó una secuencia CACGTG, denominada caja E (“E-box”), requerida para la activación transcripcional de *per*, y que representa un sitio de unión a ADN altamente específico para proteínas [119].

Gen	Alelo mutante	Período endógeno	Referencia
<i>period</i>	<i>per^S</i>	19 h	Konopka (1971) [29]
	<i>per^L</i>	29 h	Konopka (1971)[29]
	<i>per⁰¹</i>	Arrítmico	Konopka (1971) [29]
	<i>per^T</i>	16 h	Konopka (1994) [120] Hamblen (1998) [121]
<i>timeless</i>	<i>tim⁰</i>	Arrítmico	Sehgal (1994) [122]
	<i>tim^{blind}</i>	26 h	Wulbeck (2005) [123]
<i>Clock</i>	<i>dClock</i>	Arrítmico	Allada (1998) [124]
<i>cycle</i>	<i>cyc⁰</i>	Arrítmico	Rutila (1998) [125]
<i>pigment dispersing factor</i>	<i>pdf⁰¹</i>	Arrítmico o ritmo débil con período de 22.8 h	Yoshii (2009) [126] Stoleru (2004) [127]
<i>doubletime</i>	<i>dbt^S</i>	18 h	Bao (2001) [128]
<i>cryptochrome</i>	<i>cry^b</i>	Splitting en dos componentes: período largo y corto	Stanewsky (1998) [129]

Tabla 4.1: Algunos de los principales mutantes de *Drosophila*. Características de los primeros mutantes encontrados para cada uno de los principales genes reloj.

4.2.1. El reloj molecular en *Drosophila*

Como ya se mencionó en la introducción general, el mecanismo molecular del reloj de *Drosophila* consiste en dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa. Analizando la actividad locomotora de moscas modificadas genéticamente se hallaron los genes principales del reloj y sus cascadas.

En el ciclo principal, mostrado en la Figura 4.4, el heterodímero CLOCK-CYCLE (CLK/CYC) se une a las secuencias E-box y activa la transcripción de *period* y *timeless*, los cuales tienen su pico máximo al inicio del día subjetivo. Las proteínas TIM y PER se acumulan y dimerizan en el citoplasma a lo largo de la noche, luego traslocan al núcleo hacia la medianoche y junto con la quinasa DOUBLETIME se unen a CLK/CYC, inhibiendo su unión al ADN y la activación de la transcripción [29].

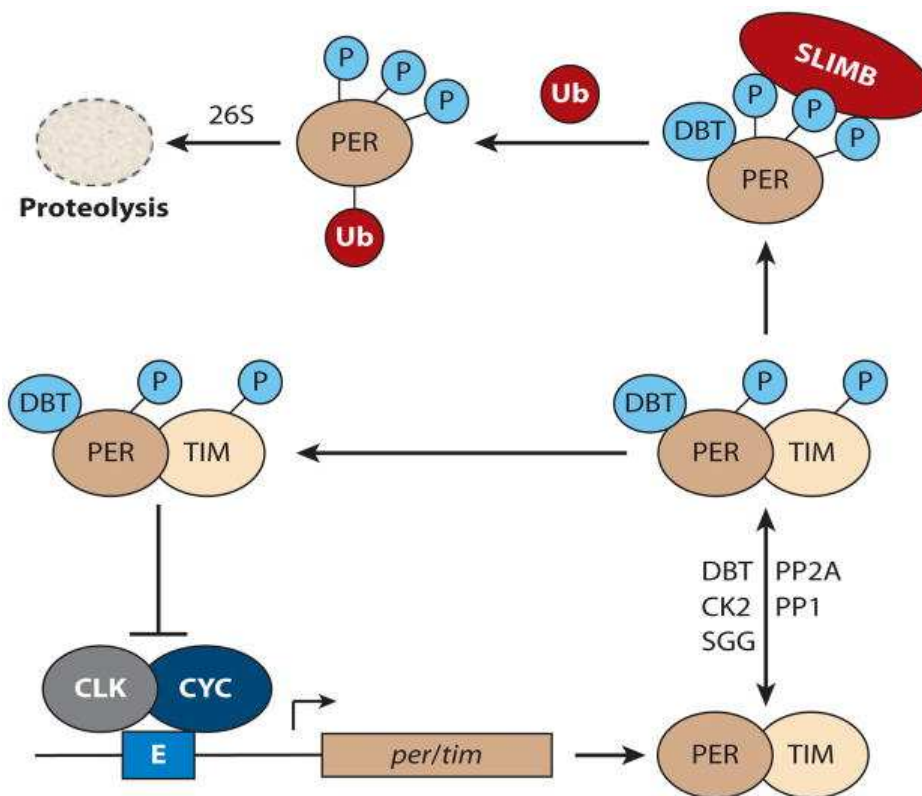


Figura 4.4: El reloj molecular central en *Drosophila*. CLK/CYC activa la transcripción de *per* y *tim*. PER y TIM son modificadas por DOUBLETIME, CASEIN KINASE 2 y SHAGGY (SGG) y son fosfatadas por PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) y PROTEIN PHOSPHATASE 1 (PP1). PER y TIM dimerizan y reprimen la actividad de CLK/CYC. Figura modificada de [130].

Si bien la retroalimentación transcripcional es el mecanismo fundamental [131], los procesos postraduccionales son los que imponen los retrasos temporales entre la activación transcripcional de CLK/CYC (tarde en el día) y la represión ejercida por PER/TIM (tarde en la noche), los cuales son necesarios para que el período endógeno sea cercano a las 24 horas [130].

El segundo ciclo, que está interconectado con el primero a través de CLK/CYC, es importante para mantener la fase y la amplitud del oscilador principal (Figura 4.5). En este ciclo, el dímero CLK/CYC activa directamente la transcripción de *Par domain protein 1* (*Pdp1*) y *vri* (*vri*), dos reguladores transcripcionales cuyos productos proteicos se unen al promotor de *clk* pero con funciones opuestas: mientras que VRI inhibe la transcripción de *clk*, PDP1 la estimula. La acumulación retrasada de PDP1 respecto de VRI establece el ritmo de acumulación de *clk*, el cual es antifásico respecto de *per* y *tim*.

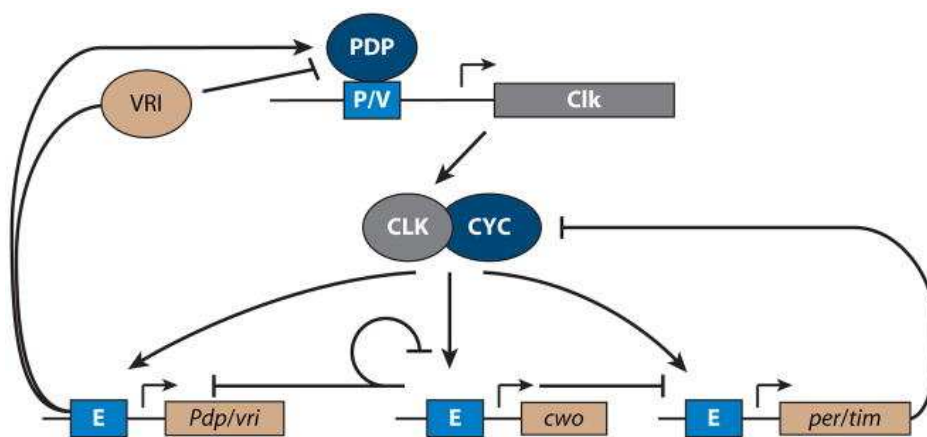


Figura 4.5: Ciclo adicional del reloj molecular de *Drosophila*. CLK/CYC activa CLOCKWORK ORANGE (CWO), PAR DOMAIN PROTEIN 1 (PDP1) y VRILLE (VRI). Figura modificada de [130].

El principal sincronizador para la mosca es la intensidad lumínica [132]. Las moscas poseen tres órganos fotoperceptivos: los ojos compuestos, los ocelos y el órgano de Hofbauer–Buchner (HB). Estos órganos forman parte de las vías de entrada de la información lumínica, pero la comunicación del *zeitgeber* al reloj molecular depende del fotopigmento CRYPTOCHROME (CRY) [133]. La luz activa a CRY, el cual se une a TIM y promueve su degradación [129, 134, 135]. La falta de TIM deja inestable a PER, que se hiperfosforila por DBT y es degradado, reseteando el reloj [136].

4.2.2. Redes neuronales

Los genes reloj se expresan en células de todo el cuerpo de *Drosophila*. Sin embargo, el reloj central o *pacemaker* está formado por alrededor de 150 neuronas denominadas *neuronas reloj* distribuidas en ambos hemisferios [137]. Avances en las técnicas genéticas y la construcción de proteínas marcadoras permitieron la identificación de las neuronas reloj y sus proyecciones, revelando que las neuronas están conectadas tanto bilateralmente como dentro de cada hemisferio [138].

Las neuronas reloj pueden dividirse según su ubicación en el cerebro, su tamaño y expresión génica. Así podemos encontrar dos grandes grupos, las neuronas laterales (LN) y las neuronas dorsales (DN), que se dividen en subgrupos de muy pocas neuronas. Las DN se subdividen en tres subgrupos a cada lado del cerebro, DN1, DN2 y DN3. Por otro lado, las LN están formadas por cuatro pequeños subgrupos, también ubicados a cada lado del cerebro. Estos subgrupos están conformados por las neuronas posteriores laterales (LPN), neuronas laterales dorsales (LNd), neuronas laterales ventrales pequeñas (sLNv) y las neuronas laterales ventrales grandes (lLNv) (Figura 4.6). Las neuronas lLNv son importantes para la anticipación de la mañana, por los que se las llama células M, mientras que las LNd/DN1 son importantes para la anticipación

de la tarde, por lo que se conocen como células E (del inglés evening) [41, 139].

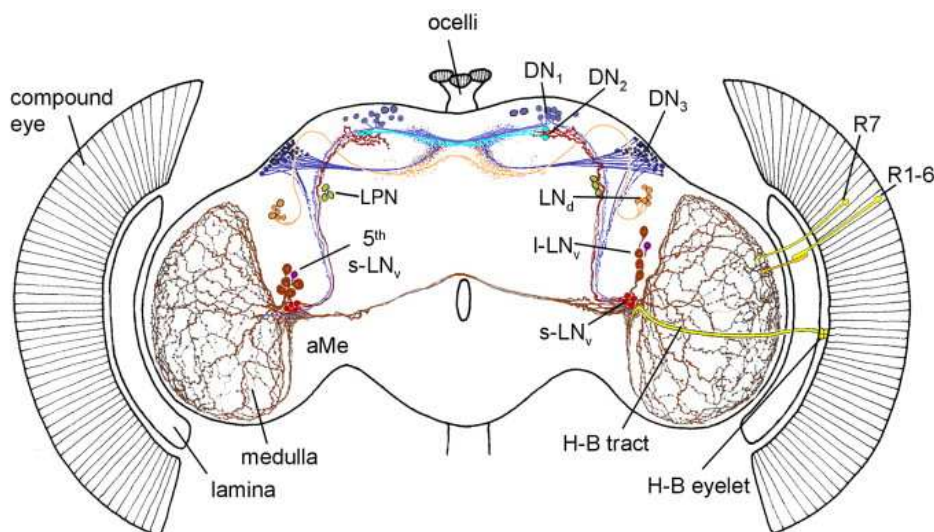


Figura 4.6: Red neuronal circadiana en la mosca. Red neuronal en el cerebro de una mosca adulta en el que se resaltan las neuronas reloj. Medulla: médula, Compound Eye: ojo compuesto, aMe: médula accesoria, Ocelli: ocelos, DN3: neuronas dorsales 3 (azul), LN_d: neuronas laterales dorsales (naranja), l-LN_v: neuronas laterales ventrales grandes (marrón), s-LN_v: neuronas laterales ventrales pequeñas (rojo), H-B: órgano de Hofbauer-Buchner, R7/8: fotorreceptores 7 y 8, R1-6: fotorreceptores 1 a 6. Figura de [140].

A pesar de conocerse las neuronas que forman el *pacemaker*, cómo está conectado el circuito y cuales son los neuropéptidos que intervienen en la comunicación entre neuronas es aún una incognita [141]. El primer neuropéptido identificado fue PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF), que es expresado por las lLN_v y por todas salvo una sLN_v [142]. La principal función de PDF parece ser sincronizar los distintos osciladores en el cerebro, ya que los mutantes nulos para este neuropéptido se vuelven arrítmicos a los pocos días de pasar a condiciones constantes, ya que pierden la sincronía de las oscilaciones moleculares dentro de las LN_v y con otros grupos neuronales [143–145].

4.3. Desarrollo de un dispositivo de monitoreo de la actividad locomotora

Algunos de los ritmos circadianos estudiados en *Drosophila* incluyen la eclosión [29], la sensibilidad olfativa [146], la inmunidad [147], ciertos aspectos del cortejo [148], y el aprendizaje y la memoria de corto plazo [149]. Pero el más estudiado es la actividad locomotora, gracias al sistema automatizado DAM (del inglés *Drosophila* Activity Monitoring), comercializado por la empresa Trikinetics.

Los registros que se utilizan habitualmente proporcionan muy poca información, ya que el dispositivo DAM solo permite saber cuantas veces cada mosca cruza un haz de luz infrarroja en el medio de un tubo de vidrio. Cada vez que la mosca cruza el haz,

el dispositivo registra una entrada. Este dispositivo funcionó muy bien inicialmente para estudiar los ciclos circadianos, ya que además de ser utilizado para determinar la ritmicidad, permite monitorear 32 individuos al mismo tiempo. Actualmente se sigue utilizando en todos los laboratorios de *Drosophila* como control de la ritmicidad de los individuos.

Sin embargo, se sabe que tiene mucha pérdida de información, ya que sólo registra la actividad de la mosca cuando ésta se mueve por determinada sección del espacio disponible. Además, dado que las moscas deben caminar una mínima distancia entre cada cruce, la resolución temporal del dispositivo DAM varía entre los 3 y 10 segundos. La resolución espacial tampoco es buena: el tubo de vidrio tiene apenas 3 mm de ancho, donde la mosca solo puede moverse caminando hacia adelante o hacia atrás, y 5 cm de largo [150]. Es por estas razones, además del alto costo de este equipo, que no consideramos al sistema DAM para estudiar la organización temporal y espacial de la actividad y descanso en *Drosophila*.

En este trabajo desarrollamos e implementamos un dispositivo al que llamamos d-Tracker, con el que monitoreamos el movimiento de *Drosophila* con alta resolución espacial y temporal. A continuación vamos a detallar el dispositivo, que nos permite cuantificar la actividad locomotora y también comportamientos complejos como la utilización del espacio. En el Apéndice 1 se puede observar el esquema del dispositivo.

El hardware del d-Tracker está compuesto por:

- Cámaras web conectadas por USB. A todas las cámaras web se les extrajo el filtro infrarrojo para que puedan registrar la actividad de las moscas en caso de iluminación infrarroja.
- Una caja contenedora que cumple la función de aislante para poder tener condiciones de luz constantes y que sostiene las cámaras.
- Una base que contiene tiras de luces LED blancas e infrarrojas conectadas a un timer. La tapa de la base es un acrílico semitraslúcido que cumple el rol de difusor para que pase la luz sin cegar las cámaras. En la parte superior la base cuenta con pasadores para que las pistas de las moscas queden fijas.

Es importante destacar que la luz infrarroja no afecta el patrón de comportamiento estudiado, ya que el sistema circadiano de *Drosophila* es insensible a la luz de longitud de onda entre 850 y 950 nm. En un principio colocamos luces rojas en el dispositivo, ya que consideramos que la longitud de onda era lo suficientemente alta para que no sea visible por las moscas. Sin embargo, observamos que las moscas comenzaban a ser activas de noche y más inactivas de día. Una de las posibles razones para esto es el 'efecto de luz de luna'. Al estar expuestas a una luz de muy baja intensidad, las neuronas que son responsables de los ritmos circadianos cambian su actividad en respuesta a estos

cambios lumínicos, lo cual serviría de adaptación a distintos fotoperíodos [151]. Las luces rojas podrían haber actuado como luz de baja intensidad, generando el mismo efecto. A partir de ese experimento, se modificó el dispositivo y se utilizaron tiras LED de luces infrarrojas. Además, observamos que al apagar o encender las luces rojas/infrarrojas, se generaban fluctuaciones grandes en la temperatura del interior del dispositivo, ya que generan mucho calor. Debido a esto se decidió mantener las luces infrarrojas prendidas constantemente. Es por esto que otra posibilidad para el cambio en el comportamiento podría haber sido que se entrenen con las fluctuaciones en la temperatura, por lo cual se comenzó a llevar registro de la temperatura en el interior del dispositivo. Pensamos que el cambio en la actividad se debió a alguno de estos dos efectos, pero como con las modificaciones en el dispositivo bastó para corregir el problema, no nos concentramos en determinar a cuál de los dos fue.

4.3.1. Configuraciones espaciales.

Con el objetivo de estudiar el uso del espacio en distintas configuraciones geométricas, utilizamos pistas rectangulares y circulares. Cabe destacar que en ambos casos la mosca se encuentra más libre que en las pistas del sistema DAM, ya que puede caminar con más espacio y hasta puede volar.

Las pistas rectangulares fueron construidas con láminas de policarbonato transparente, como se muestra en la Figura 4.7. Se las cortó de forma tal que queden 10 pistas de 1 cm de ancho y 10 cm de alto. En uno de los extremos se colocó algodón, para permitir el paso del aire pero evitando que la mosca escape, y el otro extremo se selló con la comida preparada a base de harina de maíz, como se muestra en el esquema de la figura.

Al poner moscas en pistas contiguas la ritmicidad se veía afectada por la interacción social. Esto lo notamos observando que cuando una mosca caminaba por el borde lateral de su pista, la mosca vecina la seguía en su recorrido. Debido a esto decidimos dejar pistas libres con el fin de evitar influencias sociales en el comportamiento de cada individuo, ya que el tema no era de interés para los objetivos de esta tesis. Pero queda el tema abierto para hacer experimentos de interacción social con el dispositivo en el futuro.

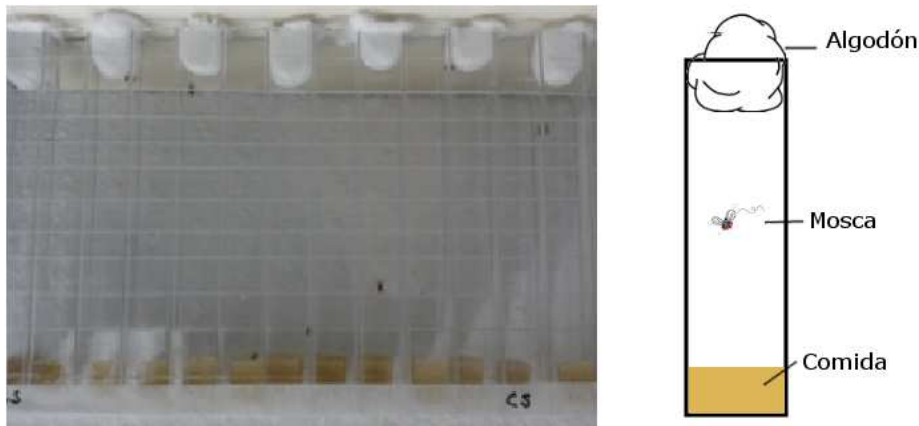


Figura 4.7: Pistas rectangulares. A la izquierda se observa una foto de las pistas rectangulares con moscas CS, con pistas libres entre moscas. A la derecha se observa el esquema de cada pista, con la comida en un extremo y el algodón en el otro. La mosca se mueve libremente en el espacio restante.

Para analizar el uso de un espacio circular, se utilizaron cápsulas de Petri de 6 y 10 cm de diámetro (Figura 4.8). Una sola mosca fue colocada por cada cápsula, de forma tal de poder evaluar el comportamiento individual.

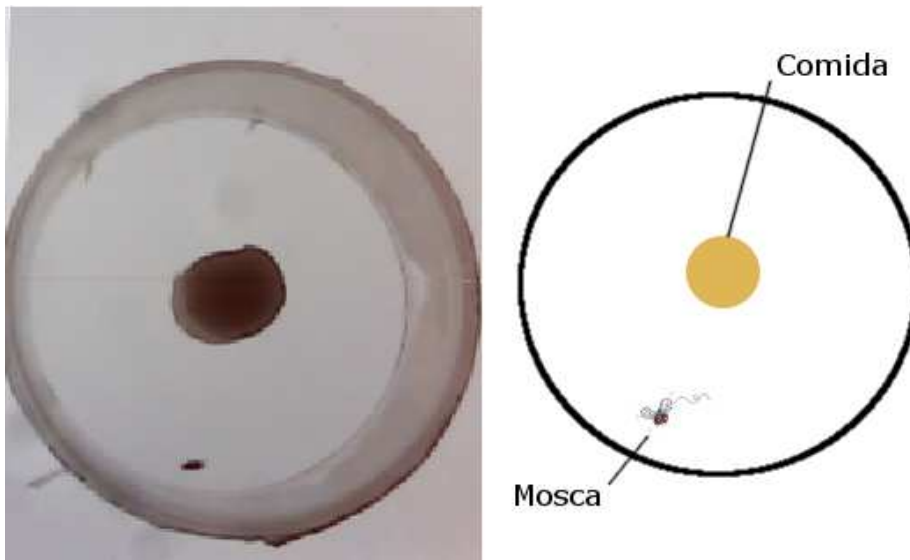


Figura 4.8: Pistas circulares. A la izquierda se observa una foto de una cápsula de Petri con una mosca. A la derecha se observa el esquema de la pista, con la comida en el centro. La mosca se mueve libremente en el espacio restante.

4.3.2. PySolo

El programa utilizado para registrar la actividad de las moscas en las pistas es PySolo-Video, una extensión para adquisición de datos de PySolo. PySolo (del italiano *pisolo*, siesta) es un software de análisis de datos desarrollado en el laboratorio de Giorgio Gilestro [152]. El programa está escrito en Python y utiliza las librerías Numpy y Scipy para los cálculos, y wxPython para la construcción de una interfaz amigable

para el usuario. PySolo-Video ofrece traducir el movimiento detectado en el video a datos de posición en dos dimensiones o a distancia recorrida con resolución de un segundo.

Una vez que las pistas con las moscas adentro están listas, se colocan en la caja y se procede a preparar el programa para realizar el seguimiento de cada individuo. Para esto en primer lugar se debe asociar una cámara web a un monitor. Luego con el mouse se deben hacer “máscaras”, que delimitan la región donde se registra el movimiento de la mosca. Para hacer esto se marcan las cuatro esquinas de la región deseada y automáticamente se forma un poliedro, como se muestra en la Figura 4.9. Cada máscara debe contener una sola mosca. Por último, se corre el programa PySolo-Acquire. Una de las ventajas de este software es que permire monitorear hasta 32 moscas al mismo tiempo, al igual que el dispositivo DAM. Sin embargo, para que entren las 32 pistas en el cuadro de una cámara web, deben ser muy pequeñas.

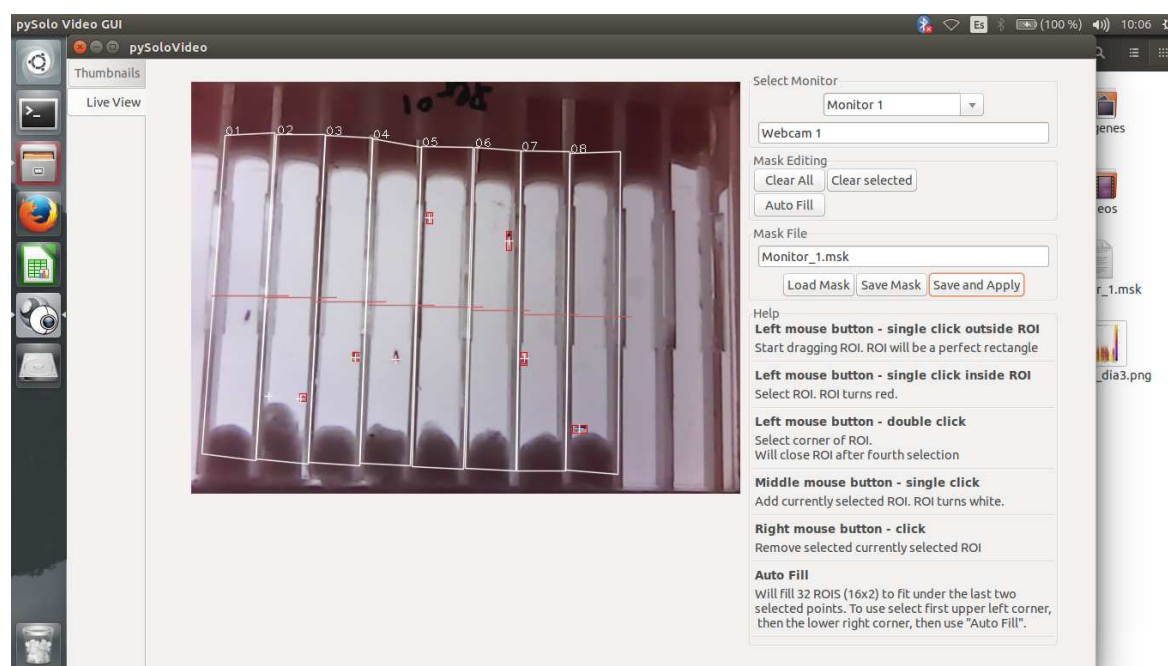


Figura 4.9: Máscaras del Pysolo-Video. Limitación del espacio donde la mosca puede moverse mediante la creación de una máscara para cada mosca en el caso de las pistas rectangulares.

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 4.10 la trayectoria de las moscas de la Figura 4.9 seguidas durante treinta segundos. Los puntos rojos corresponden a los 30 registros de las ubicaciones hechos por el programa, uno por segundo. La línea punteada representa la trayectoria. Notar que todos los individuos eligen caminar por los bordes de sus pistas, ya que prefieren evitar el centro. Esto es algo que ya se ha observado en otros animales como ratones y ratas.

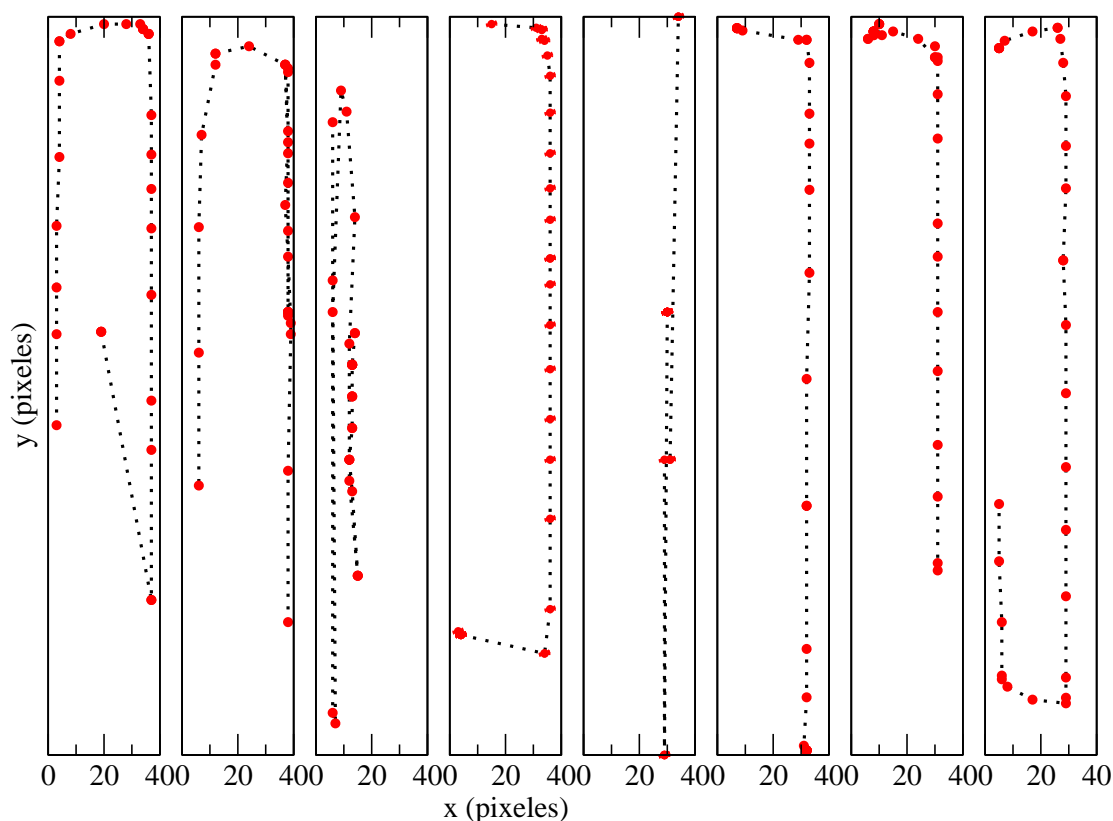


Figura 4.10: Trayectorias de ocho moscas en las pistas rectangulares. Se puede observar la actividad de las ocho moscas monitoreadas por una cámara web durante treinta segundos. Los puntos rojos corresponden a las posiciones a cada paso de tiempo, mientras que la línea punteada representa la trayectoria.

4.4. Sujetos de estudio

4.4.1. Cría y mantenimiento de las moscas

Para el mantenimiento y crianza de las líneas de *Drosophila* utilizadas en esta tesis se preparó comida estándar a base de harina de maíz, agar, levadura, sacarosa y nipagin, un agente antimicrobiano. Las líneas se mantuvieron en viales de plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura. Las moscas fueron mantenidas a 25° y 60 % de humedad en un cuarto aislado adecuado para medir ritmos circadianos en *Drosophila*. La selección de las moscas para cada experimento se realizó anestesiándolas con CO₂ y observándolas bajo lupa para distinguir machos de hembras. Mientras se las observaba eran colocadas

sobre una plataforma porosa con un flujo continuo de CO₂. Se cuidó minimizar el tiempo de exposición al CO₂ para evitar afectar el comportamiento de las moscas [153].

4.4.2. Sistema GAL4/UAS

Una de las técnicas genéticas más importantes que existen para manipular la mosca es el sistema GAL4/UAS. Este sistema permite expresar cualquier gen, ya sea de mosca o de cualquier otro organismo, de manera dirigida y específica a cualquier tipo de células y en cualquier momento del desarrollo de la mosca.

GAL4 es una proteína de levadura cuya función es activar la transcripción genética. En la levadura, GAL4 es indispensable para que se expresen los genes involucrados en que la levadura pueda digerir un tipo especial de azúcar (galactosa). GAL4 sólo puede activar genes que tienen una secuencia reguladora que se llama UAS (Upstream Activating Sequences, secuencias activadoras de la transcripción río arriba), y los genes de levadura para la digestión de galactosa tienen esta secuencia. La unión de GAL4 a las UAS es muy específica y GAL4 no puede activar la transcripción de ningún gen que no las contenga. En la mosca no existen genes homólogos a GAL4 y ningún gen de mosca tiene secuencias UAS, por lo que si se hace una mosca transgénica que exprese GAL4 no pasa nada, ya que no hay secuencias UAS endógenas. Sin embargo, si otra mosca transgénica que tenga cualquier gen clonado río abajo de las secuencias UAS (gen efector) es cruzada con la mosca que expresa GAL4, la progenie que herede ambos transgenes expresará el gen efector. Existe una gran colección de líneas que expresan GAL4 en una gran variedad de células y tejidos específicos. Por lo tanto, la expresión del gen X puede ser accionada en cualquiera de estos patrones cruzando la línea que expresa GAL4 bajo un promotor específico con moscas que portan el transgen UAS-gen X [154].

A este sistema también se ha incorporado la utilización del inhibidor de GAL4, GAL80, también proveniente de levaduras. Esto permite restringir la función de GAL4 en el patrón de expresión que determine el promotor utilizado para expresar a GAL80. El esquema del sistema completo se puede observar en la figura 4.11.

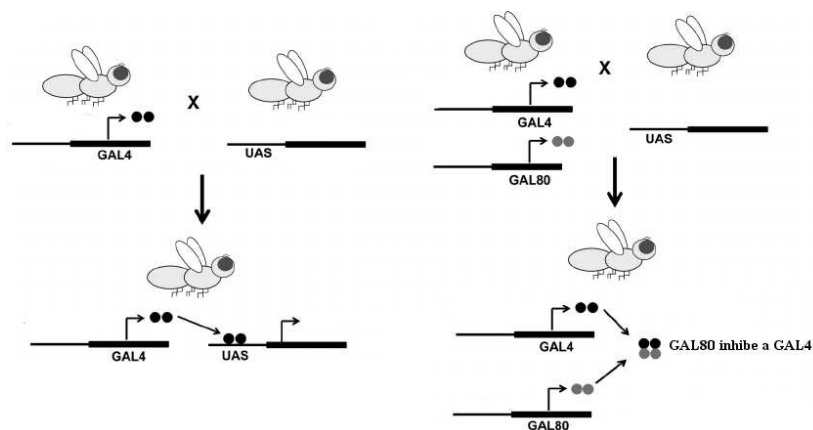


Figura 4.11: Representación esquemática del sistema GAL4/UAS. El sistema GAL4-UAS se basa en la crianza de moscas transgénicas que contienen un promotor específico del tejido que dirige la producción de GAL4 o construcciones transgénicas UAS. La progenie posee una copia de las construcciones de GAL4 y UAS y expresa el transgén de interés bajo el control del promotor de interés. Figura modificada de [154].

4.4.3. Líneas de *Drosophila* utilizadas

Para los experimentos se utilizaron moscas wild-type (Canton-S) y moscas mutantes nulas para *per* (*per*⁰¹), *tim* (*tim*⁰) y el neuropéptido *pdf* (*pdf*⁰¹).

También se expresaron distintos ARN de interferencia de *per* bajo un promotor que se expresa en todo el cerebro de la mosca (*elav-Gal4*). La efectividad del ARN de interferencia se evaluó mediante el análisis de su expresión por PCR (reacción en cadena de polimerasa) en tiempo real. Para ello se cruzó la línea *elav-Gal4* con la línea *UAS-perRNAi* y se utilizó ARN total proveniente de cabeza de moscas adultas. Para el análisis comportamental, se cruzó la línea *elav-Gal4* con la línea *UAS-perRNAi* y la progenie de estos cruzamientos, en particular las hembras vírgenes, así como los controles correspondientes fueron analizados. Además, se eliminó la expresión de *per* en todo el cerebro de la mosca exceptuando a las neuronas LNV. Para ello el patrón espacial de expresión de *elav-Gal4* se restringió a las neuronas LNV por expresión del represor GAL80 bajo el promotor *pdf* (línea *pdf-Gal80*). Como ya mencionamos, la combinación de líneas GAL4 y GAL80 en un mismo genotipo da como resultado la expresión del RNA de interferencia de *per* en aquellas células que expresan sólo GAL4, es decir en todas las neuronas del cerebro de la mosca excepto en las LNV cuyo reloj funciona correctamente. La progenie de estos cruzamientos, en particular las hembras, así como los controles correspondientes fueron analizados. Todo esto fue realizado por la Dra Lorena Franco y sus estudiantes Paula Drausal y Sabrina Riva en el laboratorio sito en el Instituto de Investigación en Biodiversidad y Medio Ambiente (INIBIOMA).

4.5. Actividad locomotora

En una primera aproximación a comprender los mecanismos que gobiernan al reloj circadiano en *Drosophila*, la actividad locomotora de distintas moscas fue registrada durante varios días. Como ya mencionamos anteriormente, la resolución temporal es de un punto por segundo para cada individuo. Una vez obtenidas las series experimentales de la posición (x,y) de la mosca a cada paso de tiempo, se realizó el análisis estadístico de los datos.

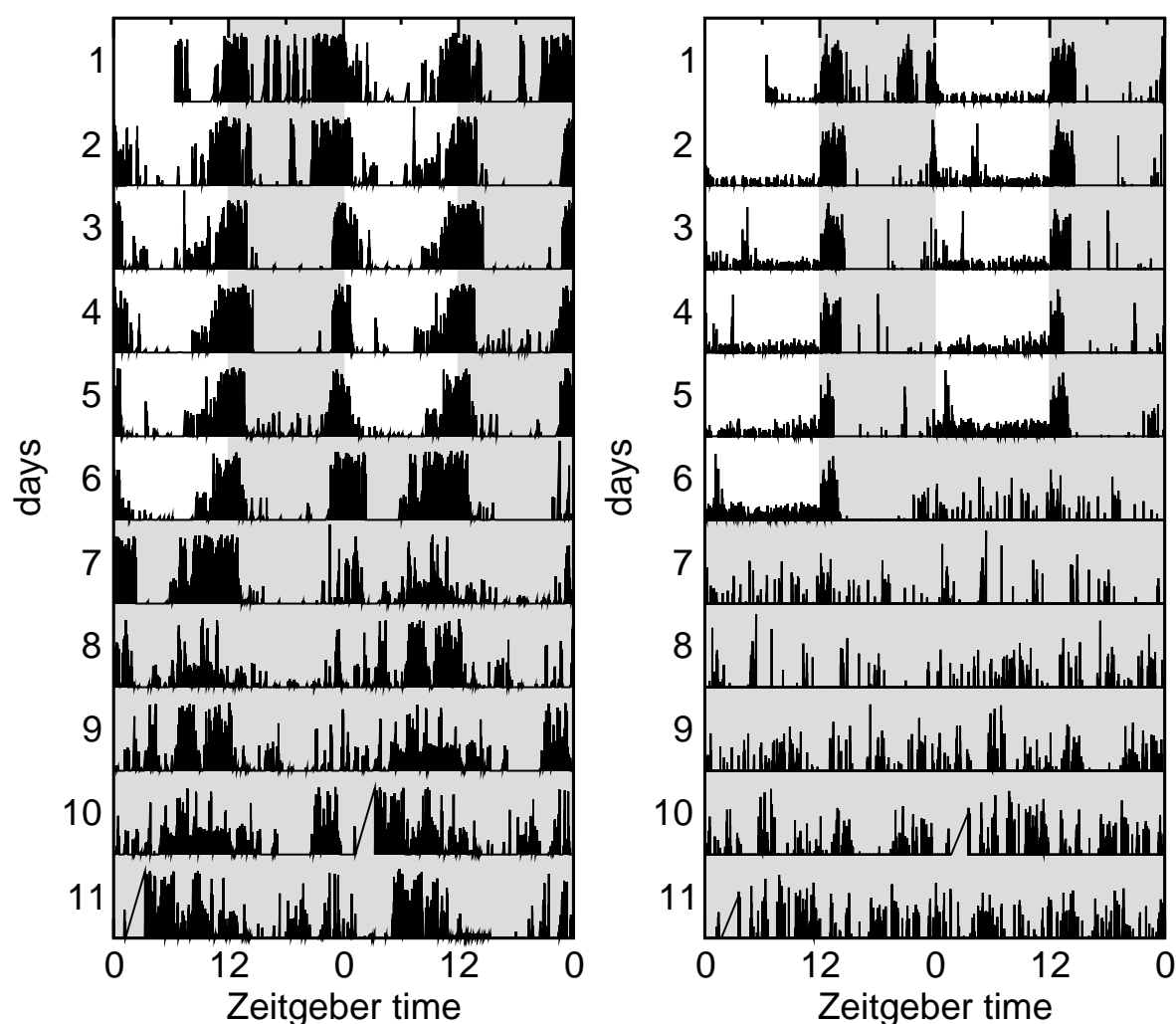


Figura 4.12: Actogramas para una mosca CS y *per* nula. Registro de las distancias recorridas por un macho CS (izquierda) y un macho *per* nulo (derecha) con resolución de un dato por segundo durante 5 días de LD y 5 días de DD. Las barras grises representan las condiciones de oscuridad.

En la Figura 4.12 puede observarse el actograma para una mosca Canton-S en la izquierda y una mutante para *per* en la derecha que incluye todos los días que duró el

experimento: cinco con ciclos LD12:12 y cinco con condiciones ambientales constantes (DD). En el caso de la mosca wild-type, mientras está en LD pueden observarse los dos picos de actividad y que se entrena con el ciclo, por lo que aparece la anticipación al cambio de luces. Luego, cuando se cambia a DD, mantiene su ritmicidad pero al no resetearse el reloj, que tiene un período endógeno ligeramente menor a las 24 horas, los ciclos comienzan cada día un poco antes. En cambio, en el caso de la mosca *per*⁰¹, puede verse que aún en LD la mosca no está entrenada, sino que aparece el fenómeno de enmascaramiento. En lugar de anticipación a los cambios hay una *startle response* o reflejo de sobresalto, es decir, al apagar las luces la mosca se asusta y comienza a moverse mucho más que antes. Luego, al pasar a condiciones DD, se vuelve completamente arrítmica, ya que su reloj está roto.

4.5.1. Leyes de potencia

Muchos procesos naturales pueden describirse por observables cuya función de densidad de probabilidad sigue una ley de la forma $f(x) = cx^{-\alpha}$, donde a α se lo denomina exponente de escala. A este tipo de comportamientos se los denomina ley de potencias.

Si tomamos el logaritmo en la ecuación anterior nos queda,

$$\log(y) = \log(c) - \alpha \log(x), \quad (4.1)$$

que es la ecuación de una recta de pendiente $-\alpha$. Es decir, si en lugar de representar los valores de x contra los de y en un gráfico, representamos sus logaritmos, $\log(x)$ contra $\log(y)$, lo que obtenemos es una línea recta. Por lo tanto si al graficar una serie de datos en log-log podemos ajustar los datos con una recta, tenemos una ley de potencias.

Una propiedad importante de las leyes de potencia es su invariancia ante cambios de escala. Es decir, $f(\lambda x) = \lambda^{-\alpha} f(x)$, conserva la misma forma. Las leyes de potencia son características emergentes de los sistemas complejos. Son aspectos de la estructura y función de estos sistemas que permanecen con auto-similitud en una amplia variedad de escalas espaciales y temporales. Estas leyes reflejan el resultado de reglas o mecanismos simples, consecuencia de unos pocos principios físicos, biológicos y matemáticos básicos.

En los sistemas físicos, se observa invariancia de escala cerca de un punto crítico. Se ha sugerido que la presencia de leyes de potencia en diversos sistemas biológicos podría implicar que éstos están próximos a una transición de fase continua. Sin embargo, hay diferencias fundamentales entre la invariancia de escala que se encuentra en los sistemas biológicos y físicos. Los sistemas críticos se pueden clasificar en términos de un pequeño número de clases de universalidad y, dependiendo de las propiedades fundamentales tales como la dimensionalidad y la simetría, sólo se observan unos pocos exponentes de escala. Sin embargo, la dinámica del comportamiento exhibe una variación considerable

en los valores de los exponentes de escala. Por último, los sistemas críticos están en equilibrio, mientras que la mayoría de los procesos que ocurren en los sistemas vivos, incluyendo el comportamiento animal, no están en equilibrio. Por lo tanto, una imagen fundamentalmente diferente es necesaria para explicar la universalidad de la invariancia de escala en el comportamiento de los animales y la falta de universalidad de los exponentes de scaling [155].

Un fractal es un objeto que es autosimilar, es decir, está formado por partes similares al objeto completo. Por más que lo miremos a diferentes escalas, siempre observamos la misma forma. Hay ejemplos naturales, como las costas marítimas, que tienen las mismas propiedades en distintas escalas, o ejemplos matemáticos, como el set de Cantor y el triángulo de Sierpinski (Figura 4.13). Para caracterizar la autosimilaridad debemos introducir la dimensión fractal, que describe el comportamiento ante los cambios de escala de las estructuras fractales. Sea d_E la dimension euclideana del espacio donde está embebido el objeto fractal. El volumen $V(l)$ de un objeto cualquiera puede ser cubierto con cajas de tamaño l y volumen l^{d_E} . Como necesitaríamos $N(l)$ cajas, entonces $V(l) = N(l)l^{d_E}$. Luego, para fractales esperamos $N(l) l^{d_f}$, donde

$$d_f = \lim_{l \rightarrow 0} \frac{\ln N(l)}{\ln(1/l)} \quad (4.2)$$

es la dimensión fractal, que es un número no entero. Por ejemplo, para el triángulo de Sierpinski necesitamos $N(l) = 3^k$ triángulos de tamaño $l = (1/2)^k$, con lo que $d_f = \ln(3)/\ln(2) = 1,585$. Los objetos con $d_f < d_E$ son fractales.

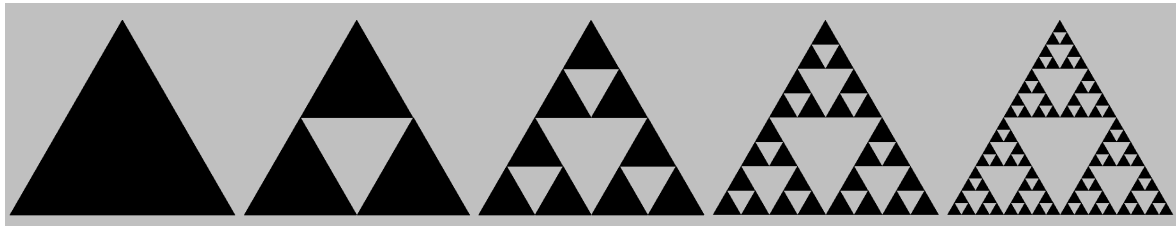


Figura 4.13: Ejemplo de un objeto fractal: el Triángulo de Sierpinski. El fractal de Sierpinski se puede construir tomando un triángulo cualquiera, eliminando el triángulo central, uniendo los puntos medios de cada lado, y repitiendo hasta el infinito el proceso en los tres triángulos restantes como el primero. De esta forma, la estructura triangular del principio se repite en distintas escalas.

Así como hay fractalidad en el espacio, también existe fractalidad temporal. Para medir la fractalidad temporal se hace de la misma forma que medimos fractalidad espacial: se construyen ventanas temporales en las que se cuentan la cantidad de eventos que contiene, y se analiza como escala con los distintos tamaños de ventanas. De esta forma, podemos obtener una cuantificación de la distribución de las fluctuaciones de una serie temporal.

4.5.2. Resultados

El comportamiento usualmente se entiende como la respuesta a un estímulo. Sin embargo, todos los animales tienen actividad espontánea. Este es el ejemplo de comportamiento más sencillo que se puede pensar, ya que por ejemplo no incluye interacción entre individuos. Es por esto que entender la actividad espontánea es importante para comprender el comportamiento del animal [155].

Para realizar el análisis estadístico de las series temporales obtenidas en los experimentos, en primer lugar se decidió que la variable de estudio sea la distancia recorrida por cada individuo a cada paso de tiempo. Para esto, se transformaron las posiciones $x(t), y(t)$ dadas por el programa de tracking en distancias $d(t) = \sqrt{x^2(t) + y^2(t)}$.

En la Figura 4.14 se muestra el registro completo de la distancia $d(t)$ recorrida por una mosca macho Canton-S en oscuridad constante luego de haber sido entrenada por un ciclo LD12:12 horas durante cinco días. En primer lugar decidimos enfocarnos en las fluctuaciones en la distancia recorrida por cada individuo. Para esto definimos $I(t) = d(t+1) - d(t)$, es decir, calculamos la diferencia entre la distancia recorrida entre dos tiempos consecutivos. En el panel inferior de la Figura 4.14 se observa un ejemplo de la señal $I(t)$ normalizada por la desviación estándar para todos los días en DD. En esta figura se puede apreciar la naturaleza circadiana de la señal. Para comenzar a entender cuáles son los procesos neuronales que hay detrás de estas fluctuaciones, calculamos la densidad de distribución de $I(t)$. Como se observa en el panel inferior de 4.14, esta distribución no es Gaussiana. La forma de esta distribución se llama leptocúrtica, y nos dice que los eventos de amplitudes grandes son mucho más probables que para una distribución normal.

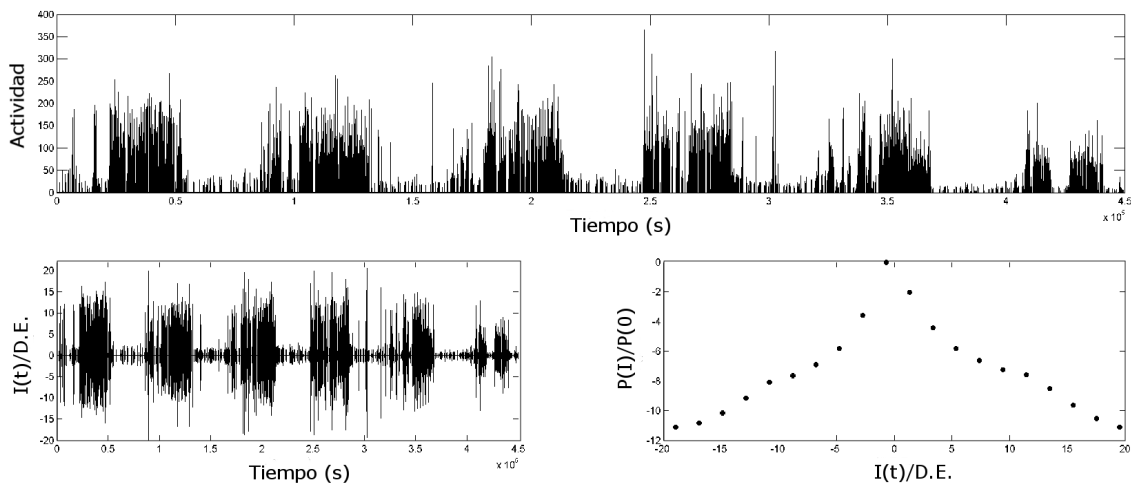


Figura 4.14: Ejemplo del análisis de las fluctuaciones en el movimiento de una mosca CS. En el panel superior se observa las distancias recorridas por la mosca durante los días de oscuridad. A pesar de las condiciones constantes, la mosca sigue siendo rítmica. En el panel inferior, a la izquierda mostramos las fluctuaciones en las distancias y a la derecha el logaritmo de su densidad de probabilidad.

En la Figura 4.15 mostramos el logaritmo de la densidad de probabilidad de $I(t)$ para todos los individuos CS y per^{01} del experimento (cada color corresponde a un individuo). Dividimos las fluctuaciones en los días correspondientes a LD y a DD. Puede observarse que en ambos casos las distribuciones son similares. Sin embargo, se observa que para las moscas mutantes en per , el triángulo es más ancho.

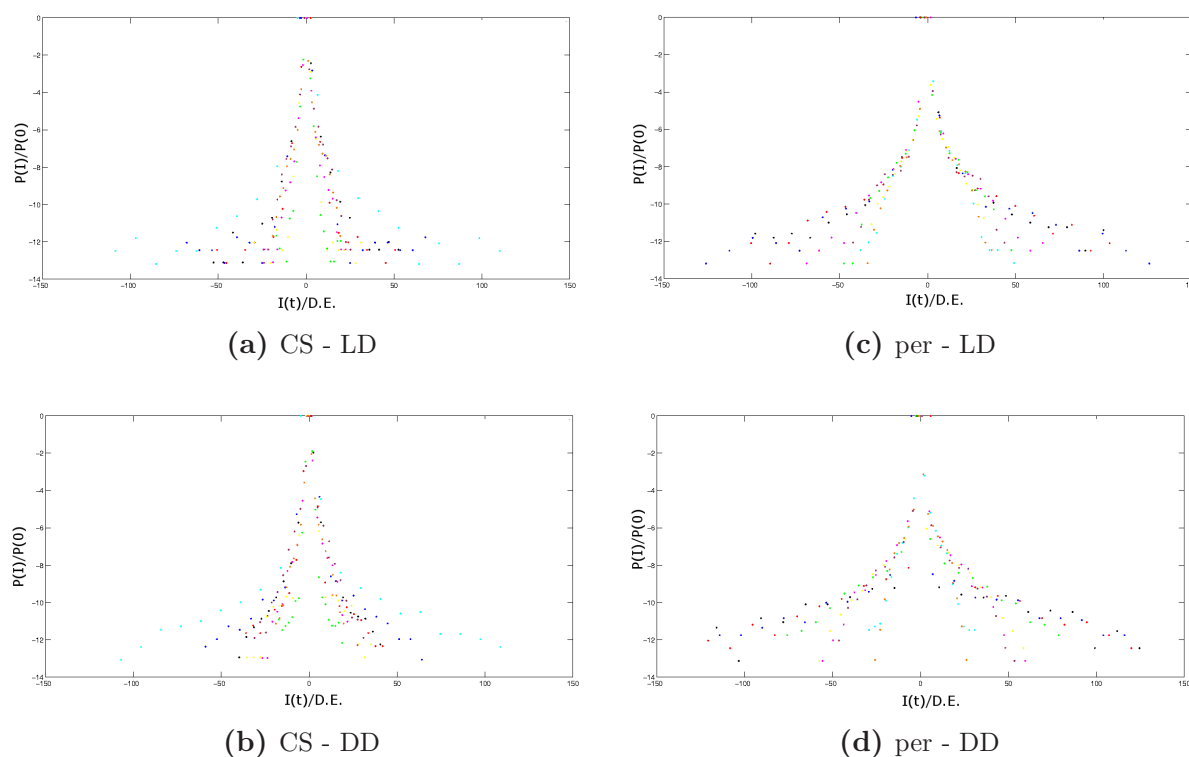


Figura 4.15: Histogramas de las fluctuaciones. Densidades de probabilidad de $I(t)$ correspondientes a 9 moscas Canton-S (CS) y 9 mutantes para per . Las fluctuaciones tienen una distribución leptocúrtica, que en el caso de las moscas mutantes es aún más ancha.

Luego se realizó una discretización de la señal obtenida, para lo cual se fijó una distancia umbral, que corresponde a la mínima distancia recorrida para considerar que la mosca estaba en movimiento. Considerando que la resolución espacial era de 5 píxeles por mm, y que el tamaño promedio de un macho equivale a 2 mm, la resolución obtenida es muy buena. Es por esto que se deben eliminar los datos espurios como el movimiento de las alas de la mosca cuando se encuentra quieta o pequeños errores del programa en la búsqueda del animal, con lo cual si el umbral es demasiado bajo todo esto entraría dentro de la actividad de la mosca cuando no lo es. En forma contraria, si el umbral que se fija es demasiado alto se eliminaría actividad real de la mosca. Se encontró que en cierto rango de umbrales considerados, no hay cambios cualitativos en las distribuciones obtenidas. Luego, se fijó el umbral en el mínimo valor para el que no se observaron cambios. A todos los datos que superaron el umbral se les asignó un valor 1, mientras que a los datos que no lo hicieron se les asignó el valor 0, que representa el

estado de quietud del animal. De esta forma se obtuvieron secuencias binarias de unos y ceros. Un ejemplo del proceso de discretización puede observarse en la Figura 4.16.

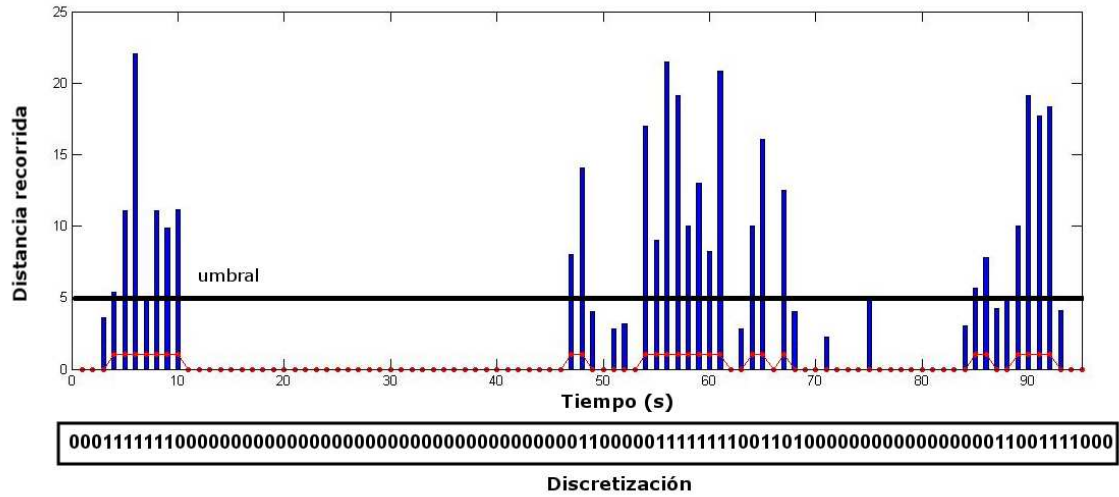


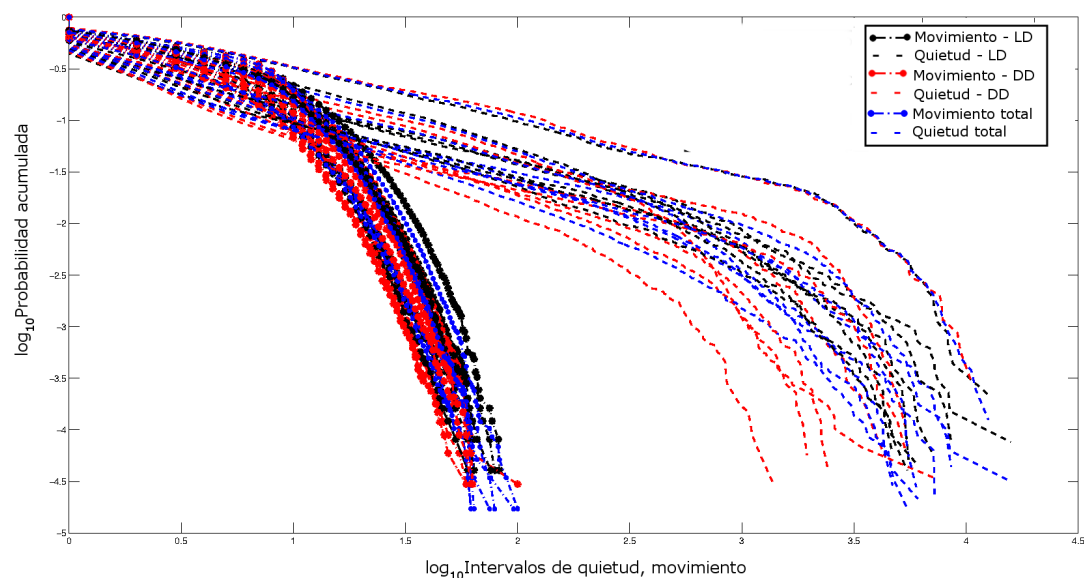
Figura 4.16: Discretización de la señal de distancias recorridas por segundo. Ejemplo de la discretización de la señal: en azul se observan las distancias recorridas por la mosca durante un minuto y medio. Si la señal pasa el umbral de 5 píxeles, se reemplaza el valor de la distancia por un 1. En caso contrario se le asigna un 0.

Aunque todas las especies tienen patrones de actividad diferentes, en un trabajo reciente de Lo *et al* [156], se encontró que durante la etapa de sueño cuatro especies de mamíferos presentan momentos de actividad. Mostraron que las distribuciones de los tiempos de sueño y de movimiento durante el mismo siguen los mismos patrones. Luego de analizar datos de ratones, ratas, gatos y humanos, encontraron que la duración de los episodios de actividad durante el sueño de todos sigue una ley de potencias con el mismo exponente. En el caso de las distribuciones de tiempos de sueño, todas siguen una distribución exponencial con tiempos característicos que dependen de la especie, en relación a la masa corporal y la tasa metabólica. Esto sugiere un mecanismo universal en la dinámica neuronal que controla el sueño [156].

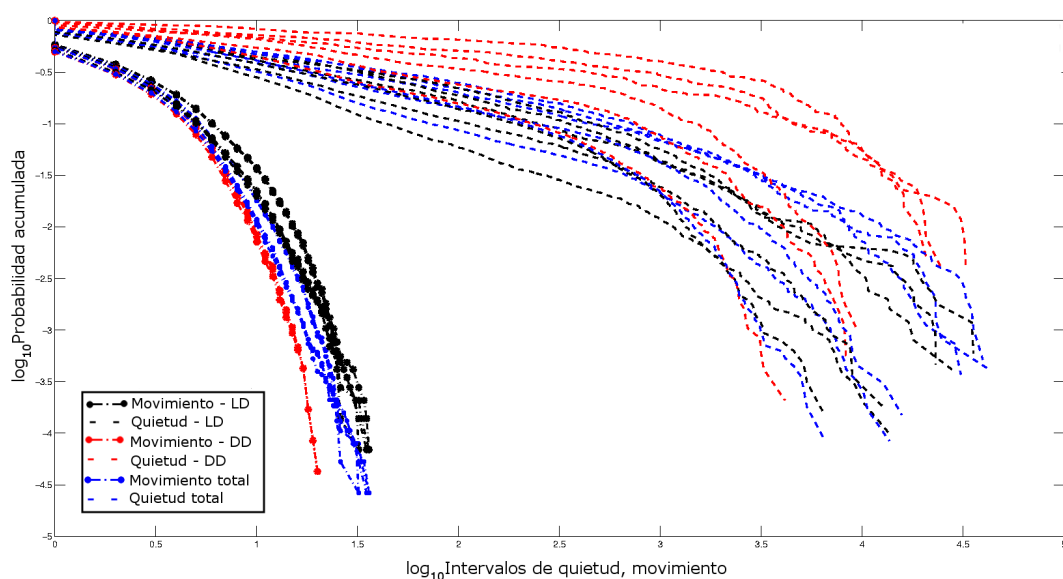
En los invertebrados se ha observado una organización temporal similar en la actividad. Dadas las similitudes encontradas en los genes reloj entre mamíferos y *Drosophila*, vamos a analizar las distribuciones de los tiempos de quietud y movimiento en la mosca en búsqueda de mecanismos universales en el comportamiento.

En la Figura 4.17 se grafica la superposición de la probabilidad acumulada de la duración de todos los intervalos de quietud y movimiento de cada uno de los individuos CS en (a) y *per nulos* en (b) graficadas en log-log. Analizamos en forma separada la estructura temporal de los intervalos en los días LD (color negro), DD (color rojo) y en los días totales (color azul). Los intervalos de quietud siguen una distribución tipo ley de potencia en una gran parte del intervalo, mientras que los intervalos de actividad siguen una distribución exponencial. En ningún caso hubo grandes diferencias entre LD

y DD para las moscas CS, mientras que para las *per* nulas la distribución de intervalos de actividad tiene tiempos distintos en LD y DD.



(a)



(b)

Figura 4.17: Distribucion de la tasa de eventos de quietud y movimiento para todos los individuos Canton-S y *per*⁰. Se analizó en forma separada los días en LD (negro), en DD (rojo) y el experimento completo (azul) para individuos normales (a) y para mutantes (b). Los intervalos de quietud tienen una distribución tipo ley de potencia en gran parte del intervalo, mientras que los de actividad tienen una distribución exponencial.

Para obtener los tiempos característicos de los intervalos de actividad, hicimos el ajuste de la distribución exponencial. En la Figura 4.18 mostramos el ejemplo del ajuste

	Total	LD DT	DD DT	Total WT	LD WT	DD WT
CS1	4.57	5.41	3.87	0.66	0.55	0.77
CS2	4.99	5.21	4.73	0.63	0.59	0.60
CS3	4.21	4.15	4.25	0.62	0.62	0.59
CS4	7.49	7.42	5.30	0.56	0.53	0.57
CS5	7.79	8.81	6.52	0.69	0.60	0.78
CS6	6.40	6.49	6.35	0.61	0.61	0.62
CS7	6.39	6.53	6.42	0.52	0.53	0.50
CS8	6.90	7.55	6.33	0.66	0.61	0.72
CS9	5.44	5.89	3.84	0.66	0.69	0.68
Distribución promedio	6.21	7.10	5.79	0.58	0.61	0.61

Tabla 4.2: Ajustes de de los tiempos de quietud y actividad para las moscas CS. Tiempos característicos obtenidos con los ajustes a una distribución exponencial para los tiempos de actividad y a una ley de potencia para los tiempos de quietud.

para una mosca, y en la Tabla 4.2 se muestran los valores de los tiempos característicos obtenidos para todos los nueve individuos CS y para las distribuciones promedio. Estos tiempos son similares para todos los individuos analizados.

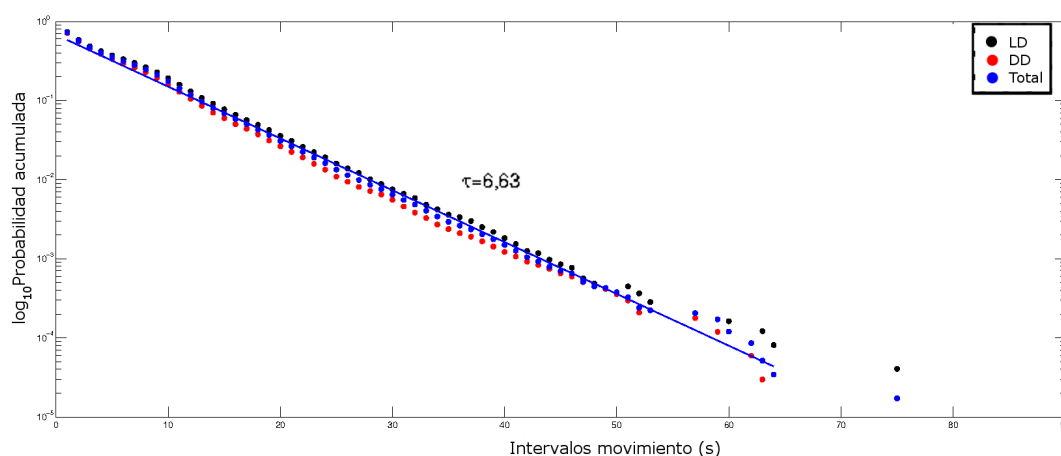


Figura 4.18: Ajuste exponencial para los intervalos de movimiento. Al graficarlo el log-normal se observa con mayor claridad la distribución exponencial. Al hacer el ajuste se obtiene que para esta mosca el tiempo característico es $\tau = 6,6$. Para todos los individuos el ajuste es similar.

Ueno *et al* analizaron las distribuciones de actividad y quietud de moscas wild-type luego de registrarlas durante 24 horas en cápsulas circulares. Ellos analizaron las series temporales separándolas en día y noche. Para poder comparar los resultados y los exponentes obtenidos, en la Figura 4.19 se grafica en log-normal la distribución de los tiempos de actividad a la izquierda y en log-log la distribución de los tiempos de quietud, ambos en DD. Al igual que ellos, encontramos que la distribución de tiempos de quietud tanto de día como de noche sigue una ley de potencias, sin diferencias significativas entre ambos. Además, los exponentes de los ajustes son los mismos que

encontraron ellos. Que no haya diferencias significativas entre las distribuciones de día y de noche en DD, como ellos proponen, sugiere que la distribución de los tiempos de quietud es independiente del reloj circadiano.

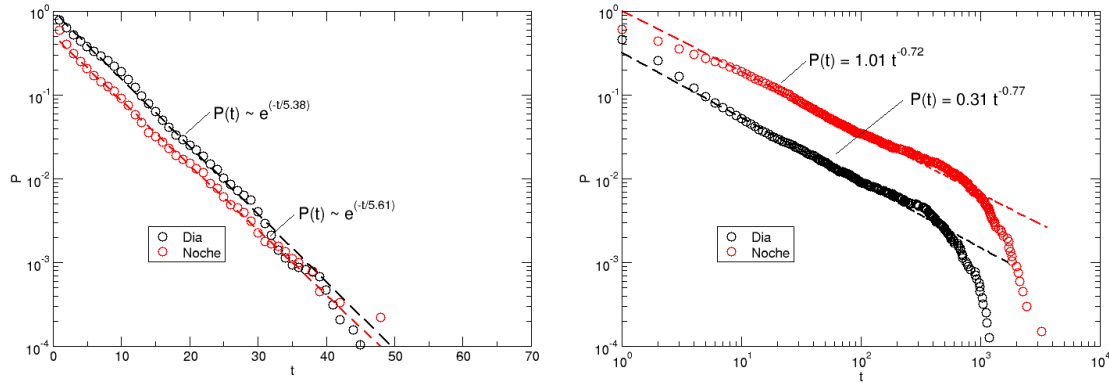


Figura 4.19: Intervalos de actividad y sueño para una mosca *CS* de día y noche. A la izquierda se grafica la distribución de tiempos de actividad en log-normal y a la derecha la distribución de los tiempos de quietud en log-log.

Para verificar esto, calculamos las mismas distribuciones pero para una mosca nula en *per*, es decir, que tiene el reloj roto, también en DD. Si la ley de potencias de los tiempos de quietud dependiera del reloj, para estas moscas debería ser distinta. En la Figura 4.20 mostramos que para las moscas *per*⁰ obtenemos las mismas distribuciones que para las moscas *CS*. Nuevamente tanto de día como de noche obtenemos una ley de potencias para los tiempos de quietud y una distribución exponencial para los tiempos de actividad. De estos resultados concluimos que el reloj no es quien genera estas distribuciones.

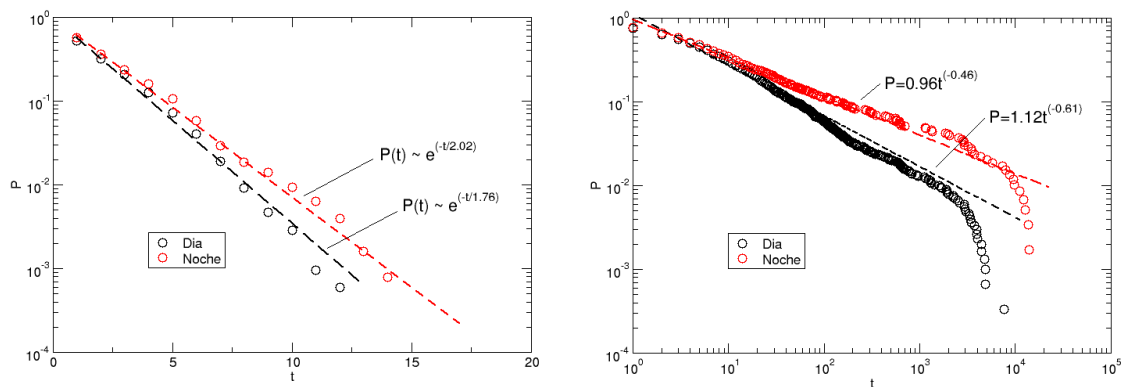


Figura 4.20: Intervalos de actividad y sueño para una mosca *per*⁰ de día y noche. A pesar de tener el reloj roto, las distribuciones correspondientes al día y la noche son iguales que para las moscas *CS*, mostrando que no dependen del reloj.

Respecto a la diferencia con los resultados del trabajo de Lo [156], en el que los tiempos de actividad siguen una ley de potencias y los de sueño una distribución exponencial, vale destacar que en las moscas el sueño se define como un tiempo de quietud mayor a cinco minutos, usualmente medido con el sistema DAM. Debido a la alta resolución del d-Tracker, al igual que en el trabajo de Ueno, los tiempos de quietud de esa longitud casi no aparecen. De hecho, la ley de potencias de la distribución de tiempos de quietud tiene tiempos de segundos a pocos minutos.

Otro trabajo en el cual se analizaron las distribuciones de los tiempos de quietud en mamíferos es el realizado por Proekt *et al* [155]. Ellos propusieron un marco teórico para encontrar invariancias de escala en sistemas fuera del equilibrio, incluyendo comportamientos en animales. En particular, mostraron que la activación del comportamiento de actividad en ratones es invariante de escala. Siguiendo este trabajo, calculamos la distribución de los tiempos de actividad, pero en este caso definiendolos el tiempo entre dos episodios de quietud con un tiempo mayor a un tiempo umbral T_{th} . Es decir, se considera que la mosca está descansado cuando para un tiempo mayor a T_{th} se encuentra sin actividad. En el caso del trabajo de Proekt, ellos registraron la actividad de ratones durante 22 días y calcularon las distribuciones con tiempos umbrales entre 30 y 1000 segundos. Encontraron que las distribuciones de los tiempos de actividad colapsan al reescalarlas dividiendo al tiempo por T_{th} lo que se muestra en el panel (B) de la Figura 4.21.

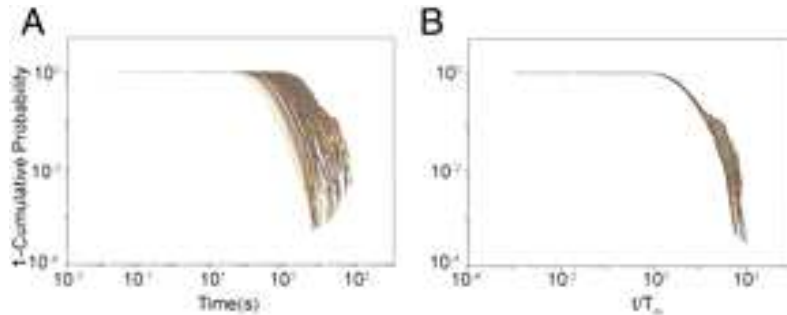


Figura 4.21: Los intervalos de actividad colapsan para los ratones. (A) Distribución de los tiempos entre intervalos de quietud para ratones para tiempos umbrales T_{th} entre 30 y 1000 segundos. (B) Mismas distribuciones reescaladas dividiendo al tiempo por T_{th} . La actividad de los ratones fue monitoreada durante 22 días. Figura tomada de [155].

Al realizar lo mismo para las moscas Canton-S en LD, encontramos que las distribuciones además de colapsar, colapsan usando la misma función de scaling que en los ratones. En la Figura 4.22 se muestran las distribuciones sin el scaling en el inset y colapsadas en el cuadro principal. Esto tiene la misma forma para todas las moscas analizadas. Además, el colapso es bueno en todo el rango, con un ancho similar al de los ratones. Sin embargo, para ventanas del orden de los 30 segundos ya no funciona, ya que los tiempos de los experimentos son distintos y en consecuencia su estadística

también. Dado que la mosca vive alrededor de 20 días, los experimentos son mucho más cortos y se mezclan distintas etapas de la vida de la mosca adulta, mientras que el ratón vive seis meses. Sin embargo, es notable que haya un rango donde da igual que el ratón y con la misma función de scaling. Esto da una idea de algún mecanismo del reloj compartido entre mamíferos e insectos.

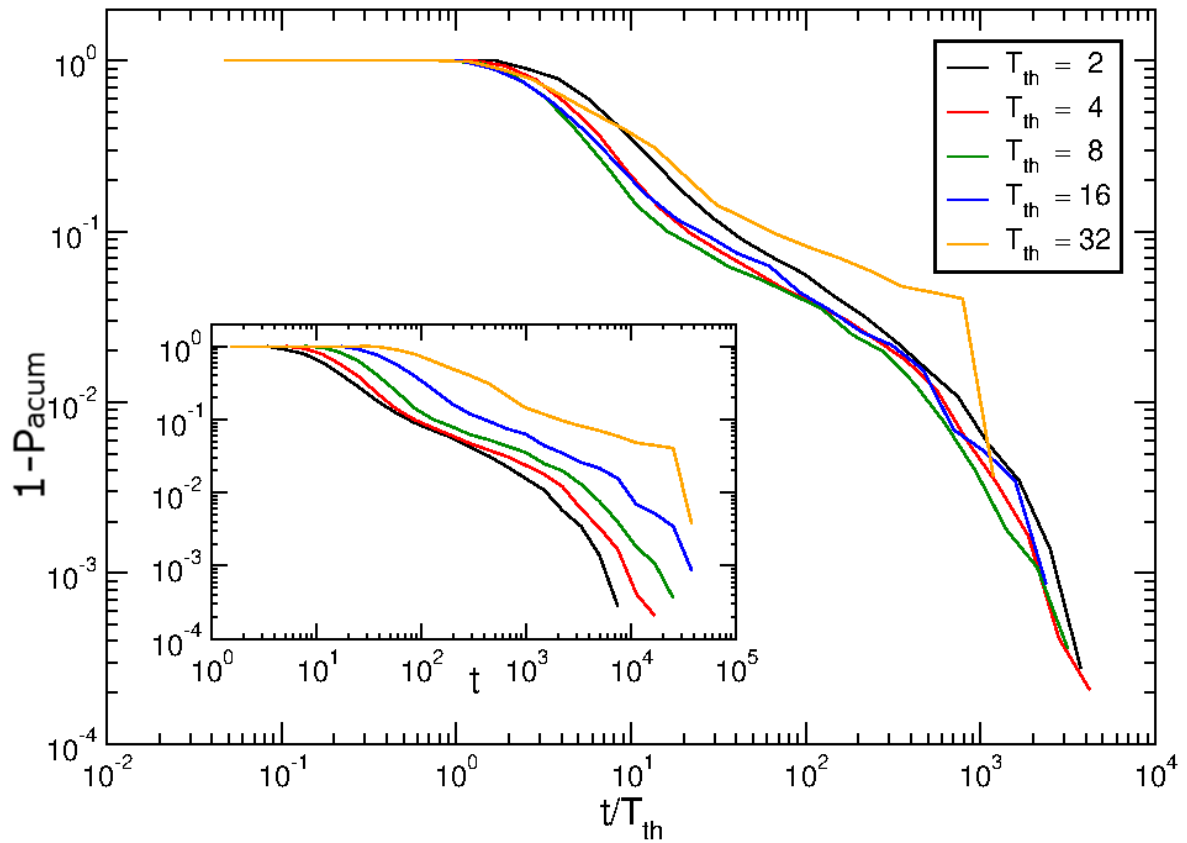


Figura 4.22: Los intervalos de actividad colapsan también para las moscas. Distribución de los tiempos entre intervalos de quietud para una mosca CS en LD para T_{th} entre 2 y 32 segundos reescaladas dividiendo al tiempo por T_{th} . En el inset se observan las distribuciones sin el reescalo.

En el caso de las moscas CS en DD, la función de scaling depende de cada mosca y el colapso no se da en todo el rango. En la Figura 4.23 se muestra a modo de ejemplo la distribución de los tiempos de actividad para dos moscas en DD. En el caso de una la función de scaling es $t/T_{th}^{0,9}$, mientras que en el otro es $t/T_{th}^{0,35}$. Además, se observa que solo hay colapso en la región de la izquierda, donde dado que es una distribución de probabilidad acumulada, no nos da ninguna información.

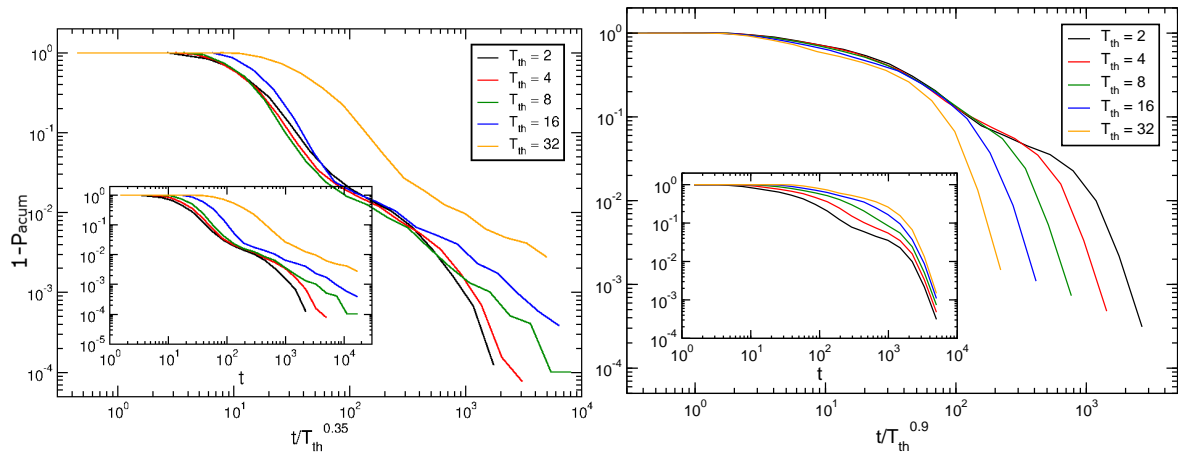


Figura 4.23: Intervalos de actividad para las moscas CS en el caso de DD. Se grafican las distribuciones de dos moscas distintas. Se obtiene que la función de scaling depende de cada individuo y además las distribuciones con distintas ventanas no colapsan en todo el rango.

Esto nos lleva a pensar de que a pesar de lo notable de la similaridad en los resultados entre el ratón y la mosca para rangos cortos, la distribución de los tiempos de quietud medida de esta forma no es una buena herramienta para estudiar la estadística de los patrones de quietud y movimiento de la mosca, ya que requiere una estadística más larga en el tiempo. Es por esto que decidimos, siguiendo el trabajo de Chialvo y Antenodo [157], interpretar la actividad de las moscas como procesos de punto.

Un proceso puntual temporal es un proceso estocástico compuesto por una serie temporal de eventos binarios que ocurren en tiempo continuo. A diferencia de los procesos de valor continuo, que pueden asumir cualquiera de los valores en cada punto del tiempo, un proceso puntual puede tomar sólo uno de dos valores posibles, indicando si un evento ocurre en ese momento. En cierto sentido, esto hace que los modelos de probabilidad usados para describir datos de procesos puntuales sean relativamente fáciles de expresar matemáticamente. Sin embargo, la mayoría de las técnicas estándar de procesamiento de señales están diseñadas principalmente para datos de valor continuo. En nuestro caso, un evento es una actividad de la mosca por encima del valor umbral establecido. Luego, el proceso puntual quedará caracterizado por los intervalos intereventos.

Como se observa en la Figura 4.24, un evento comienza con el primer segundo de actividad, representado por un uno. El tiempo interevento se define como la cantidad de pasos temporales desde ese momento al comienzo del segundo evento, independientemente si está mayormente compuesto por quietud (0) o movimiento (1).

quietud son prácticamnete iguales incluso a tiempos cortos. Esto indica que al estar su reloj roto, tanto en LD como en DD tienen otras patrones temporales de distribución de eventos.

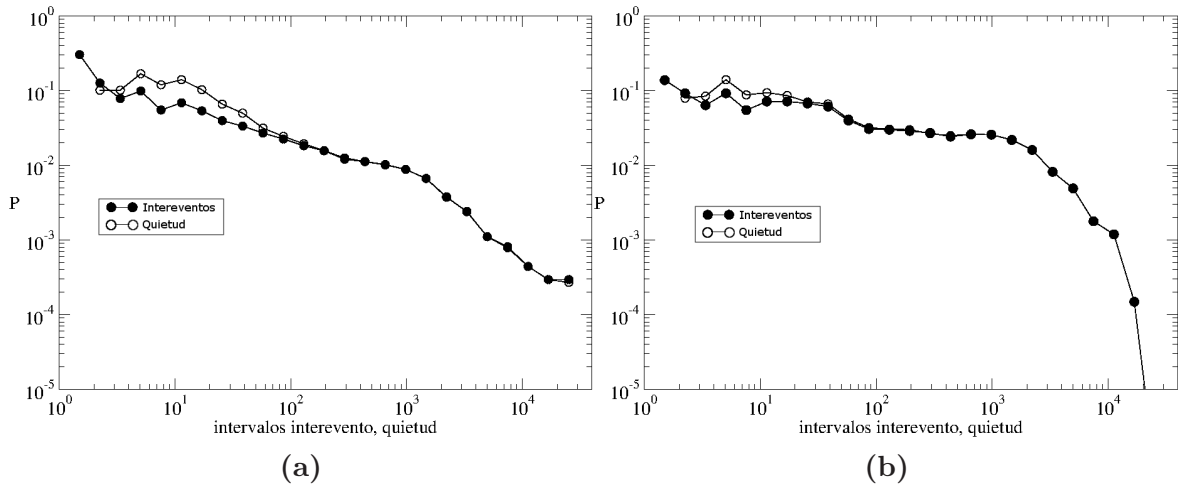


Figura 4.26: Distribución de tiempos de episodios de quietud e intereventos para las moscas *per nulas*. Los símbolos llenos corresponden a los intervalos de tiempos intereventos y los vacíos a los intervalos de tiempos de inmovilidad. Se analizaron los días en LD (a) y en DD (b) por separado.

Luego, calculamos la distribución de la tasa de eventos R . Para esto, dividimos la serie en n intervalos iguales de longitud T , y contamos el número de eventos N para cada ventana. Luego, la tasa de eventos se define como $R_n = N_n/T$. En la Figura 4.27 se muestra la distribución de R para distintas ventanas de T graficadas en log-log. El gráfico de la izquierda corresponde a una mosca CS en LD y el de la derecha a la misma mosca en DD. Se puede ver que aunque cambia ligeramente, en ambos casos la distribución de la tasa de eventos R tiene la misma forma, lo cual confirma que el reloj sigue funcionando de la misma manera aún en condiciones ambientales constantes.

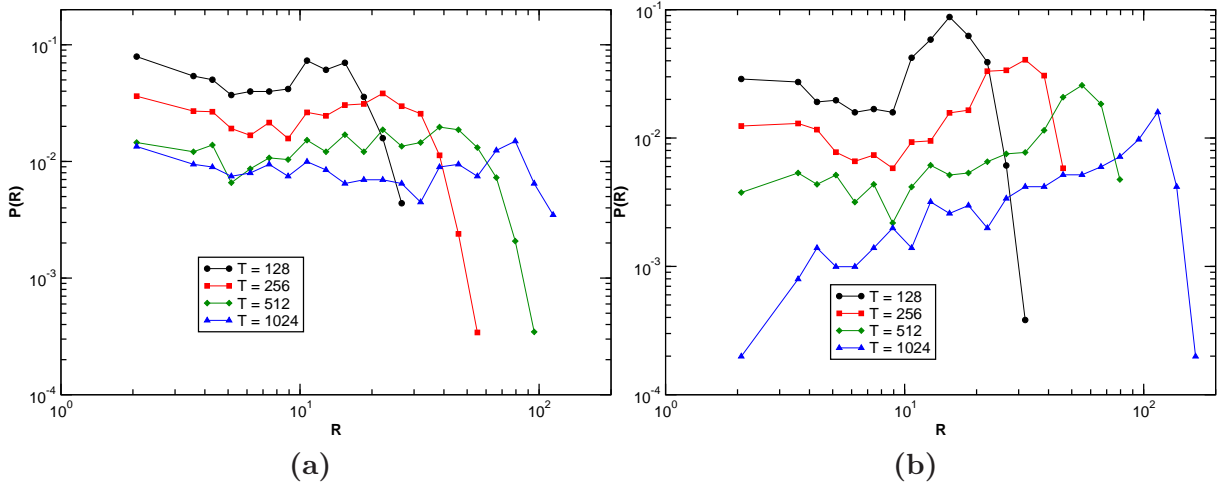


Figura 4.27: Distribución de la tasa de eventos para una mosca *CS*. La distribución de R tiene la misma forma para todas las ventanas. Nuevamente se analizaron en forma independiente los días en LD (a) y en DD (b) y no se encontraron diferencias para las moscas wild-type.

En la Figura 4.28 se muestran las curvas de la misma mosca de nuevo en LD y DD pero colapsadas. Es importante destacar que incluso en DD las curvas colapsan con el mismo exponente en la función de scaling. Además, nuevamente encontramos que se obtiene lo mismo que lo encontrado para ratones en el trabajo de Chialvo [157], donde la distribución de la tasa de eventos colapsa también con la misma función de scaling. Esto resulta inesperado, y refuerza la hipótesis de un mecanismo universal que gobierna al reloj.

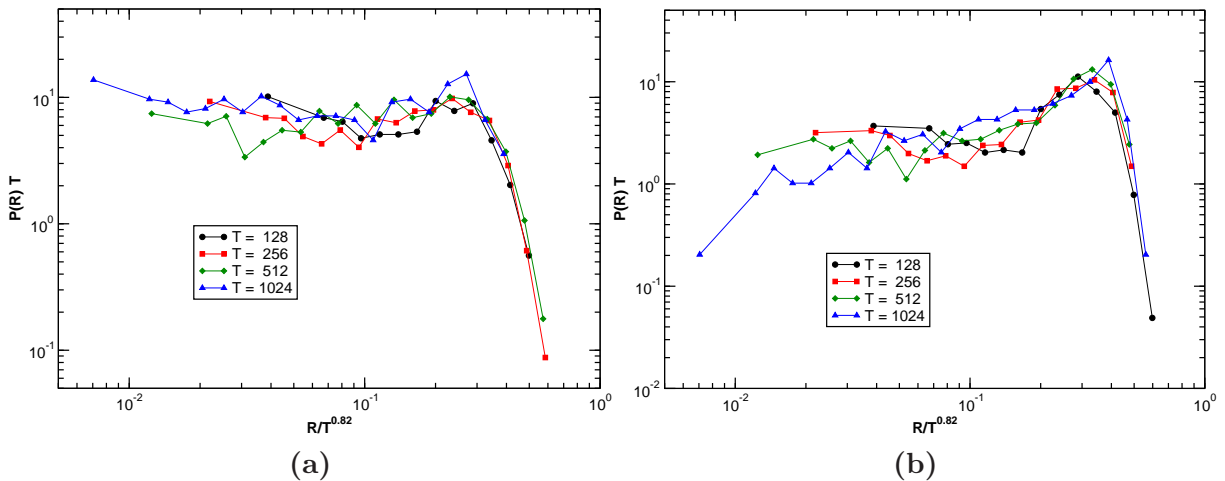


Figura 4.28: Colapso de la distribución de R para una mosca *CS*. Las curvas colapsan tanto en LD (a) como en DD (b) con la misma función de scaling.

Por completitud, en la Figura 4.29 se muestra el colapso de las curvas para todos los individuos *CS* del experimento. Aunque hay variabilidad entre individuos, la función de scaling es la misma para todos.

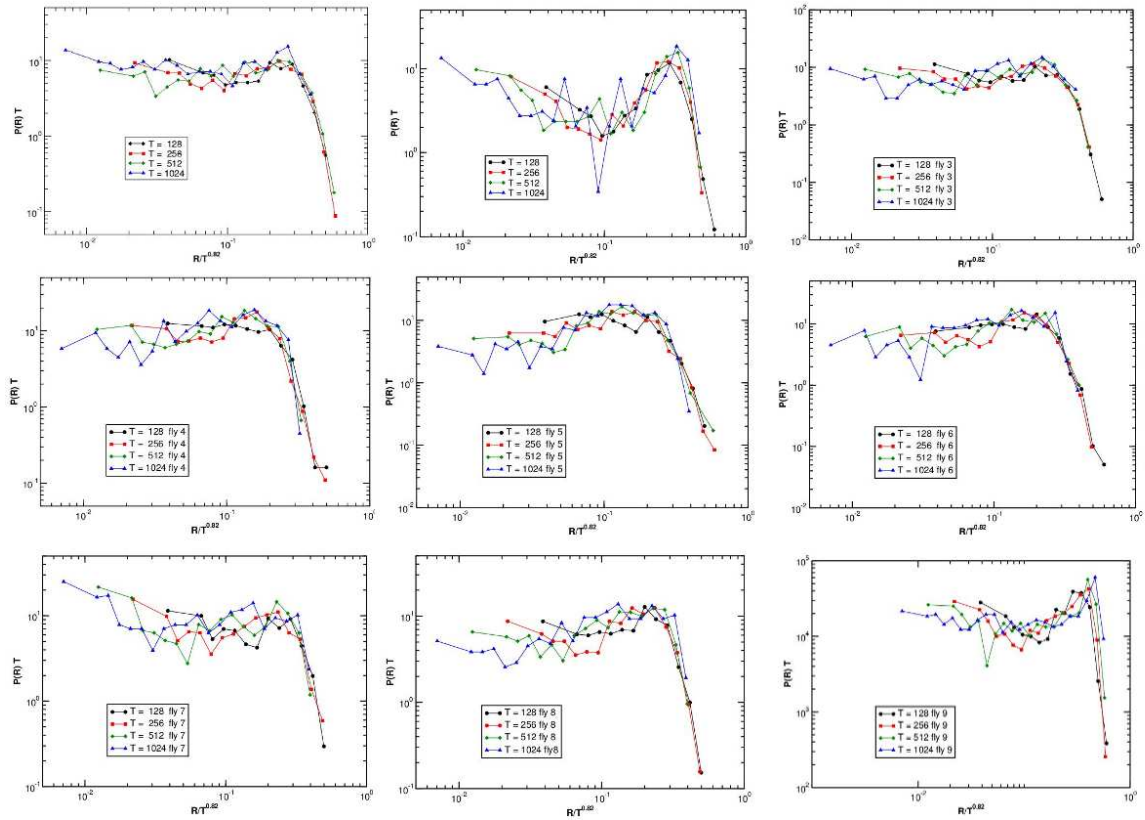


Figura 4.29: Colapso de la distribución de R para todas las moscas CS en LD. Si bien se observa variabilidad entre las moscas, las curvas de todas las moscas colapsan con el mismo exponente en la función de scaling.

En el caso de las moscas *per* nulas, las distribuciones son claramente distintas entre LD y DD, como se observa en la Figura 4.30. Nuevamente a la izquierda se grafica la distribución de R de una mosca mutante en LD y a la derecha en DD. Se puede ver que incluso en el caso de LD, cuando los individuos muestran el efecto de enmascaramiento con el ciclo externo, las distribuciones no tienen invariancia de escala y las curvas no se pueden colapsar. Esto nos indica que el reloj no está funcionando de la misma forma que las moscas CS. Cuando la mosca *per* nula está en DD y tiene en condiciones ambientales constantes, el cambio de escala de la distribución es significativo. En este caso la distribución se muestra en log-normal, ya que R no llega a 20. Esto da cuenta que en oscuridad total el reloj de las moscas mutantes no funciona.

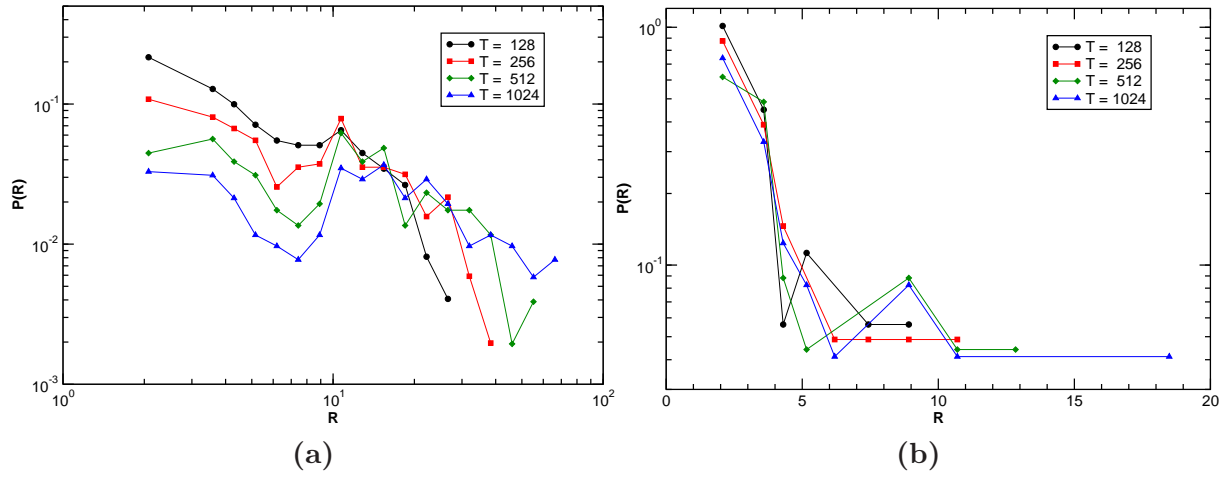


Figura 4.30: Distribución de la tasa de eventos para una mosca per^0 . A diferencia de las moscas wild-type, para las mutantes si hay claras diferencias entre el análisis en LD (a) y en DD (b).

Para evaluar la presencia de fractalidad en un conjunto de datos utilizamos el factor de Fano (FF) y el factor de Allan (FA). El factor de Fano se define como la variancia del número de eventos contados en un tiempo específico o ventana temporal T dividido por el promedio de eventos en esa escala de tiempo, y está dado por:

$$FF(T) = (\langle N_k \rangle^2 - \langle N_k^2 \rangle) / \langle N_k \rangle \quad (4.3)$$

Para un proceso fractal puntual, el FF varía como función de la ventana T como $FF(T) = 1 + (T/T_0)^\alpha$, donde α , llamado exponente fractal, es un factor entre 1 y 0. Si $\alpha > 0$, el fenómeno que representa contiene agregación de puntos sobre un período relativamente grande de escalas de tiempo. Si $\alpha = 0$, los procesos son Poissonianos y la ocurrencia de tiempo es descorrelacionada. Otra medida que relaciona la variabilidad de eventos sucesivos y que es útil para detectar eventos agregados en un proceso puntual, es el factor de Allan. El FA se define como la variancia de la ocurrencia de eventos para eventos específicos de tiempo T dividido por dos veces el promedio del número de eventos en un tiempo dado.

$$FA(T) = (\langle (N_{k+1} - N_k)^2 \rangle) / (2 \langle N_k \rangle) \quad (4.4)$$

Este factor se interpreta de manera similar al FF, pero a diferencia de este último, el FA indica la variabilidad del número de eventos para ventanas temporales sucesivas.

En la Figura 4.31 se grafican los FF y FA en función de la ventana T para los días completos del experimento, dividiendo las series en tres casos: serie completa, días en LD y días en DD. En el panel superior se muestra el caso de las series completas para una mosca CS y una per^{01} . Hay un rango donde ambos crecen como T^d . Hacer un cambio aleatorio entre los intervalos de quietud y movimiento modifica ambos factores

principalmente reduciendo el límite superior de la región de escala de potencia. Esto indica que las propiedades de escala son parcialmente debidas a la distribución de los intervalos de quietud y movimiento. En el panel inferior se grafican las series divididas entre los días LD y DD para el mismo individuo. Puede observarse que en el caso de la mosca CS no hay diferencias significativas entre ambos, mientras que para la mosca mutante en *per* cambia la pendiente de ambos factores al pasar a DD.

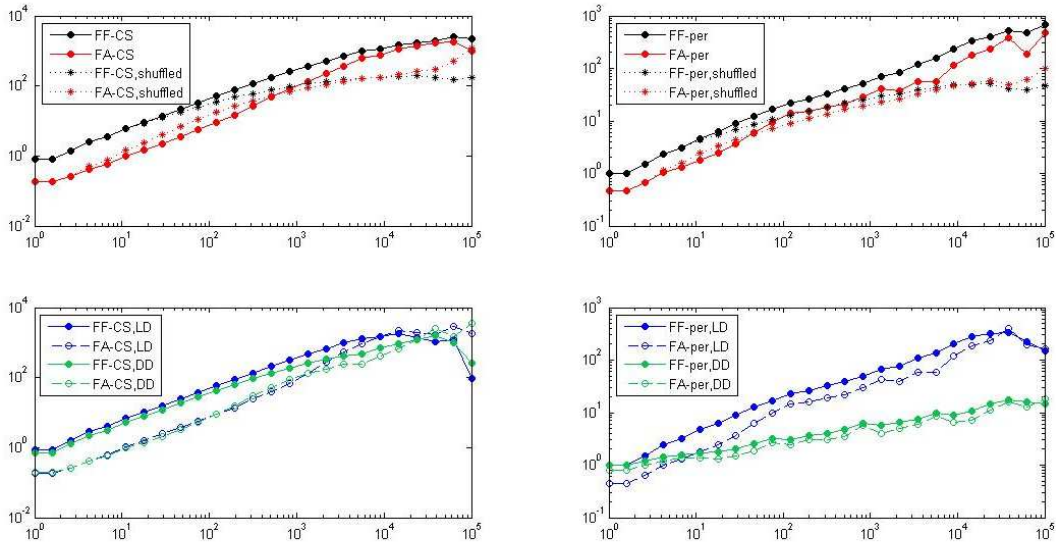


Figura 4.31: Factor de Allan y Fano para moscas CS y *per*⁰¹. Factor de Fano y Allan como función del tamaño de la ventana temporal T . Se hizo el análisis de las series completas y divididas entre el ciclo LD y el DD para un individuo salvaje (Canton-S) y un individuo mutante nulo para *per*.

En resumen, los resultados muestran que el movimiento de las moscas CS es libre de escala. Esto coincide con lo encontrado para ratones y humanos, lo que sugiere que hay algún proceso universal que regula la ritmicidad en la actividad locomotora. Cuando el reloj funciona con normalidad, no se encontraron diferencias significativas al analizar separadamente los días en LD y los días en DD. En el caso de las moscas *per*⁰¹, el reloj está roto y esto se ve reflejado en las propiedades estadísticas de sus patrones de actividad. Con todas las herramientas utilizadas se observaron diferencias entre las moscas wild-type y las mutantes.

4.6. Oviposición

En esta sección describiremos los experimentos realizados para dilucidar si el reloj circadiano está involucrado en el comportamiento de puesta de huevos de las hembras fecundadas en la mosca *Drosophila melanogaster*.

4.6.1. Antecedentes

Como mencionamos, la ritmicidad circadiana en *Drosophila* ha sido reportada en distintos comportamientos, y entre ellos se encuentra la puesta de huevos de las hembras fecundadas. La oviposición es un fenómeno complejo resultado de dos procesos fisiológicos: la vitelogénesis y la retención de huevos [158]. La deposición de huevos fertilizados incluye una serie de eventos que comienza con la producción de oocitos a la puesta de huevos en sitios seleccionados. Se encontró que la puesta de huevos en *Drosophila melanogaster* tiene un ritmo cercano a las 24 horas, y que continúa en condiciones constantes (DD), demostrando su naturaleza circadiana. También fue mostrado que el período presenta compensación térmica (20, 24 y 28°) y nutricional (dieta alta y baja en proteínas) [159]. Sin embargo, el ritmo de oviposición está muy poco estudiado. La mayoría de los estudios fueron realizados a nivel poblacional y no individual, con lo que no es sorprendente que no se hayan detectado ritmos, ya que hay mucha variación entre individuos. En los pocos estudios que hay donde las moscas fueron analizadas en forma individual se encontró que al menos el 50 % de las moscas son rítmicas. Esto hace suponer que la falta de ritmos en condiciones constantes (DD o LL) puede ser un artefacto que surge de medirlos en poblaciones [160].

Aún queda por dilucidarse cuáles son las bases genéticas, cuál es el circuito neuronal responsable de la puesta de huevos y si hay regulación hormonal entre otros aspectos [160].

4.6.2. Protocolo del experimento

Los ensayos de comportamiento de oviposición se realizaron utilizando moscas de 5 o 6 días post-eclosión. Antes de comenzar el ensayo, se introdujo una hembra y un macho vírgenes en cada vial con comida durante tres días, para que el macho fecunde a la hembra. Luego de ese tiempo, se cambió la hembra a un vial nuevo que sólo tenía una cucharita con comida y una espátula de levadura, para estimular la puesta de huevos. En cada ensayo se transfirió cada hembra manualmente a un vial nuevo con una cucharita sin huevos cada cuatro horas, y se retiró la cucharita con huevos del vial para su posterior medición, como se observa en la Figura 4.32. De esta forma obtuvimos seis puntos por día (9 am, 1 pm, 5 pm, 9 pm, 1 am, 5 am) para cada hembra. El conteo de los huevos se realizó en forma individual bajo lupa. Cada experimento se inició con 20 hembras sincronizadas en ciclos controlados LD de 12 horas, y fueron monitoreadas en esta condición por dos días y luego cambiadas a condiciones de oscuridad constante (DD) por 7 días consecutivos.

Tanto en los momentos de oscuridad de los primeros dos días como en los ciclos de oscuridad constante al ingresar al cuarto de las moscas contábamos con una luz roja tenue para poder hacer el cambio de viales sin afectar el comportamiento de puesta de

huevos. La poca visibilidad y el cansancio en la madrugada fueron los dos principales factores que llevaron a que varias moscas se escapen de los viales durante el traspaso, perdiendo cantidad de individuos a lo largo del experimento.



Figura 4.32: Setup del experimento de oviposición.(a) Viales dispuestos en una gradilla de metal. En cada vial se encuentra una mosca hembra y una cucharita con medio y levadura sellado con algodón. (b) Cucharitas con medio y una punta de espátula con levadura, donde se pueden observar los huevos puestos luego de un período de cuatro horas.

A lo largo de esta tesis se realizaron tres ensayos de puesta de huevos siguiendo el procedimiento descrito con distintas líneas de moscas mutantes. En el primer ensayo se trabajó con moscas Canton-S, *per*⁰ y *tim*⁰, para verificar si el reloj molecular está involucrado en el comportamiento de oviposición. En el segundo ensayo, se utilizaron moscas que no expresan el gen reloj *per* pero sólo en el cerebro, a diferencia de las mutantes *per*⁰ que no expresan el gen en ningún tejido. Por último, en el tercer ensayo se utilizaron moscas que no expresan *per* sólo en las neuronas LNV. En los dos últimos ensayos también se midió la deposición de huevos en los controles correspondientes. Todos los experimentos fueron realizados en el INBIOMA junto a la Dra Lorena Franco, el Dr Sebastián Risau Gusman y el Dr Pablo Gleiser.

De acuerdo al periodograma obtenido, cada individuo se clasificó como rítmico, débilmente rítmico o arrítmico:

- Rítmico: los datos se ajustaron a una función con un período cercano a las 24 horas. El pico correspondiente al período asignado fue el único pico que pasaba al menos una línea de significancia.
- Arrítmico: los datos no se ajustaron a ninguna función periódica.
- Débilmente rítmico: se encontraron componentes rítmicos pero la probabilidad asociada no alcanzó a superar alguna línea de significancia.

4.6.3. Periodograma de Lomb-Scargle

Debido a problemas con el funcionamiento de las computadoras debido a razones descritas en el Apéndice A en reiteradas oportunidades en los distintos experimentos

la adquisición de datos se vió interrumpida. Es por esto que para analizar el período de las series temporales de los experimentos utilizamos el periodograma de Lomb-Scargle.

El periodograma de Lomb-Scargle es una técnica de análisis espectral que puede ser aplicada a series temporales no equiespaciadas en el tiempo y forma parte de los métodos de análisis espectral por mínimos cuadrados. Para una serie temporal $X(t_n)$, donde $n = 1, \dots, N$ (número de elementos de la serie temporal) con media cero y varianza σ^2 , el periodograma de Lomb-Scargle se define como:

$$P(\omega_i = 2\pi f_i) = \frac{\hat{S}_\tau(\omega_i)}{2\sigma^2} = \frac{1}{2\sigma^2} \left(\frac{XC_\tau^2(\omega_i)}{CC_\tau(\omega_i)} + \frac{XS_\tau^2(\omega_i)}{SS_\tau(\omega_i)} \right), \quad (4.5)$$

donde ω_i es la frecuencia angular y f_i forman el conjunto de frecuencias en las que se desea calcular el periodograma. Cada término de la ecuación 4.5 está definido por:

$$XC_\tau(\omega_i) = N \sum_{n=1}^N X(\tau_n) \cos[\omega_i(t_n - \tau(\omega_i))] \quad (4.6)$$

$$CC_\tau(\omega_i) = N \sum_{n=1}^N X(\tau_n) \cos^2[\omega_i(t_n - \tau(\omega_i))] \quad (4.7)$$

$$XS_\tau(\omega_i) = N \sum_{n=1}^N X(\tau_n) \sin[\omega_i(t_n - \tau(\omega_i))] \quad (4.8)$$

$$XC_\tau(\omega_i) = N \sum_{n=1}^N X(\tau_n) \sin^2[\omega_i(t_n - \tau(\omega_i))] \quad (4.9)$$

$$(4.10)$$

y τ que está definida por

$$\tau = \frac{1}{2\omega_i} \arctan \left[\frac{\sum_{n=1}^n \sin(2\omega_i t_n)}{\sum_{n=1}^n \cos(2\omega_i t_n)} \right] \quad (4.11)$$

4.6.4. Resultados

Como primer medida se analizó el comportamiento de oviposición en hembras control (Canton S) ciclos de luz y oscuridad de 12 horas durante 6 días. En la Figura 4.33 se grafica el promedio de los huevos puestos por cada hembra en cada punto medido. Las barras grises representan las horas de oscuridad y las barras blancas las horas de luz. Se observa que las hembras CS ponen huevos en forma rítmica con un período de 24.18 horas y un pico de deposición entre las 17 y las 21 hs. Cabe mencionar que sólo el 50 % de las hembras mostró ritmicidad. Este porcentaje de hembras rítmicas podría atribuirse a la cantidad de días de registro (sólo se analizaron los últimos 4 días), ya que la inspección visual de los periodogramas de todas las moscas examinadas ($n=15$)

sugiere una clara tendencia a la ritmicidad que no resulta significativa con $\alpha = 0,05$.

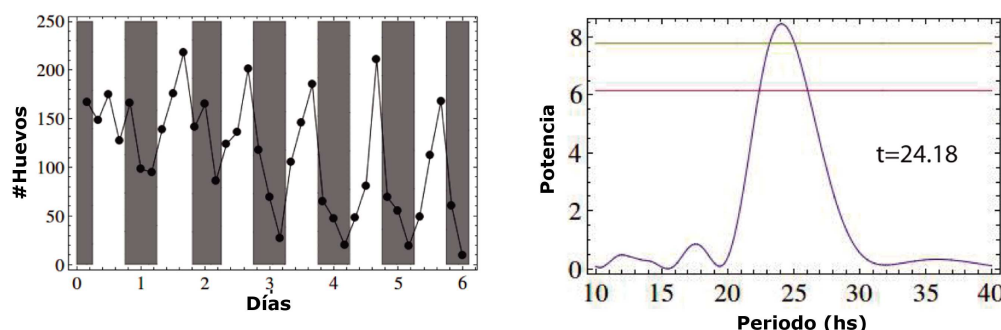


Figura 4.33: (a) Medición de los huevos puestos en cada punto. Se observa que el mayor momento de puesta de huevos al comienzo de la noche. (b) Periodograma Lomb-Scargle para la serie de datos.

Primer ensayo

Con la idea de estudiar los efectos de la pérdida de función del reloj en el control circadiano de oviposición, se realizaron experimentos de oviposición con hembras mutantes nulas para los genes del reloj, *per* y *tim*, y hembras control en condiciones de luz-oscuridad durante dos días y luego oscuridad constante durante siete días contando la cantidad de huevos depositados por cada mosca cada cuatro horas. De esta forma se buscaba poner en evidencia la naturaleza endógena del comportamiento de oviposición. Bajo la sincronización impuesta por el ciclo de luz y oscuridad, tanto las moscas con fenotipo salvaje como las mutantes en los genes reloj pudieron sincronizarse (Figura 4.34), mostrando en todos los casos un pico en la deposición en la medición correspondiente al intervalo entre las 17 y las 21 horas. Sin embargo en condiciones constantes (DD) las hembras mutantes nulas para *per* y *tim* mostraron arritmicidad en el perfil de oviposición en contraposición a las hembras control, donde casi el 70 % de ellas posee un período muy cercano a las 24 hs (tabla 4.3). De estos resultados concluimos que el reloj molecular es necesario para el control circadiano de la oviposición.

Genotipo	N	Período	% rítmicas
<i>CS</i>	12	23.78 ± 0.2	66.6 (8/12)
<i>per</i> ⁰	12	—	0 (0/12)
<i>tim</i> ⁰	12	—	0 (0/12)

Tabla 4.3: Los mutantes nulos de *per* y *tim* no tienen ritmos de oviposición. Se observa que de las doce moscas de cada cepa, solo las CS presentan ritmo circadiano en la oviposición.

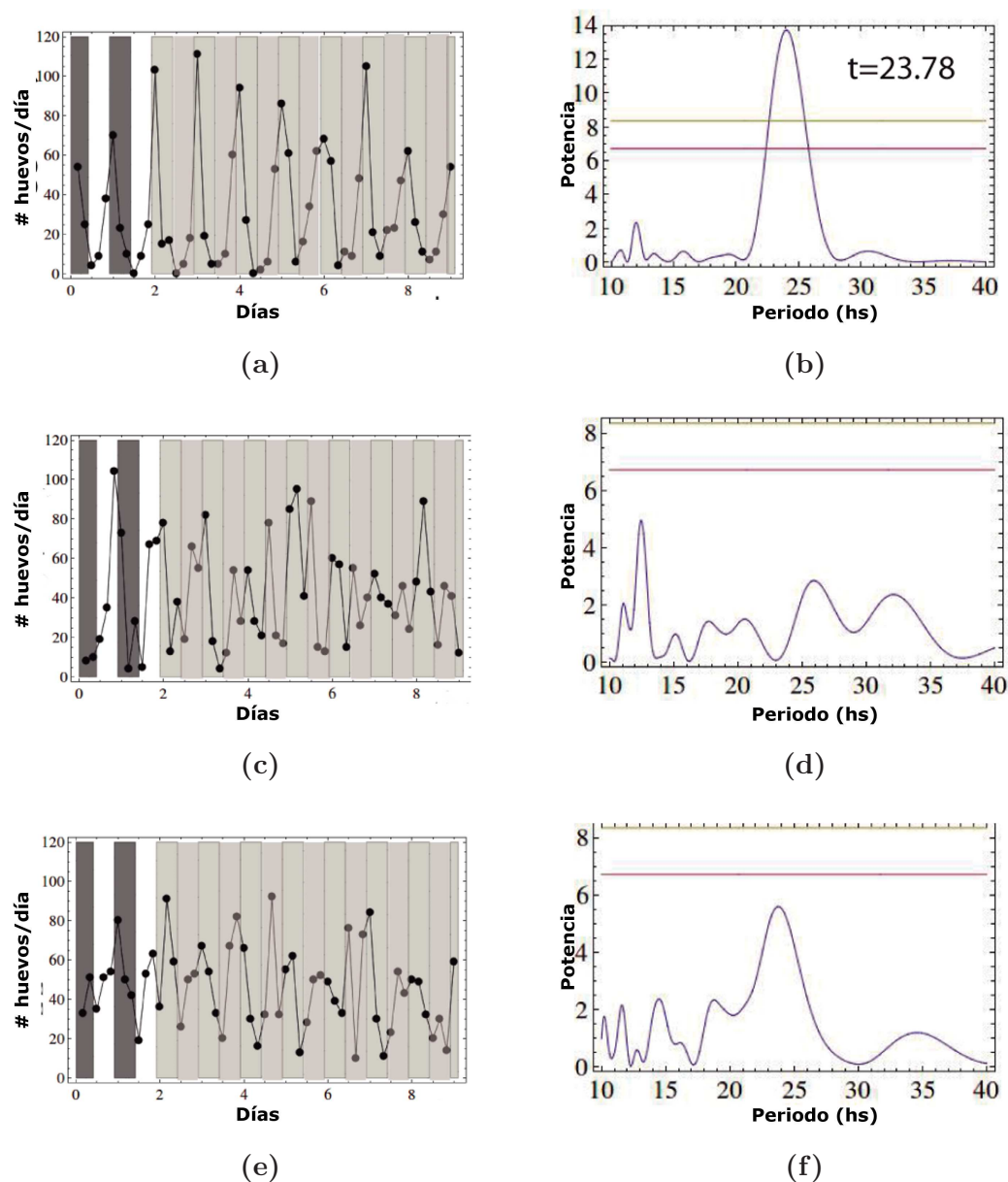


Figura 4.34: El reloj molecular controla la oviposición. Perfil representativo de la puesta de huevos y su correspondiente periodograma Lomb-Scargle para una mosca: (a-b) CS, (c-d) *per*⁰¹ y (e-f) *tim*⁰¹.

Segundo ensayo

En el primer ensayo concluimos que el reloj molecular es importante para la generación de ritmos en la puesta de huevos. Sin embargo, los mutantes utilizados no expresan los genes reloj en ningún tejido, ni en el cerebro ni en los osciladores periféricos. Con el objetivo de determinar si el ritmo de oviposición depende del reloj central, se midió la puesta de huevos en la línea *elav* > *per*^{RNAi}, que no expresa *per* en el cerebro pero si lo hace en los otros tejidos. También se midió en sus controles *elav*/+ y *per*^{RNAi}/+. Las hembras fecundadas fueron monitoreadas durante dos días en ciclos LD de 12 horas, y luego cambiadas a condiciones de oscuridad constante (DD) durante

siete días, contando los huevos depositados en las cucharitas cada cuatro horas.

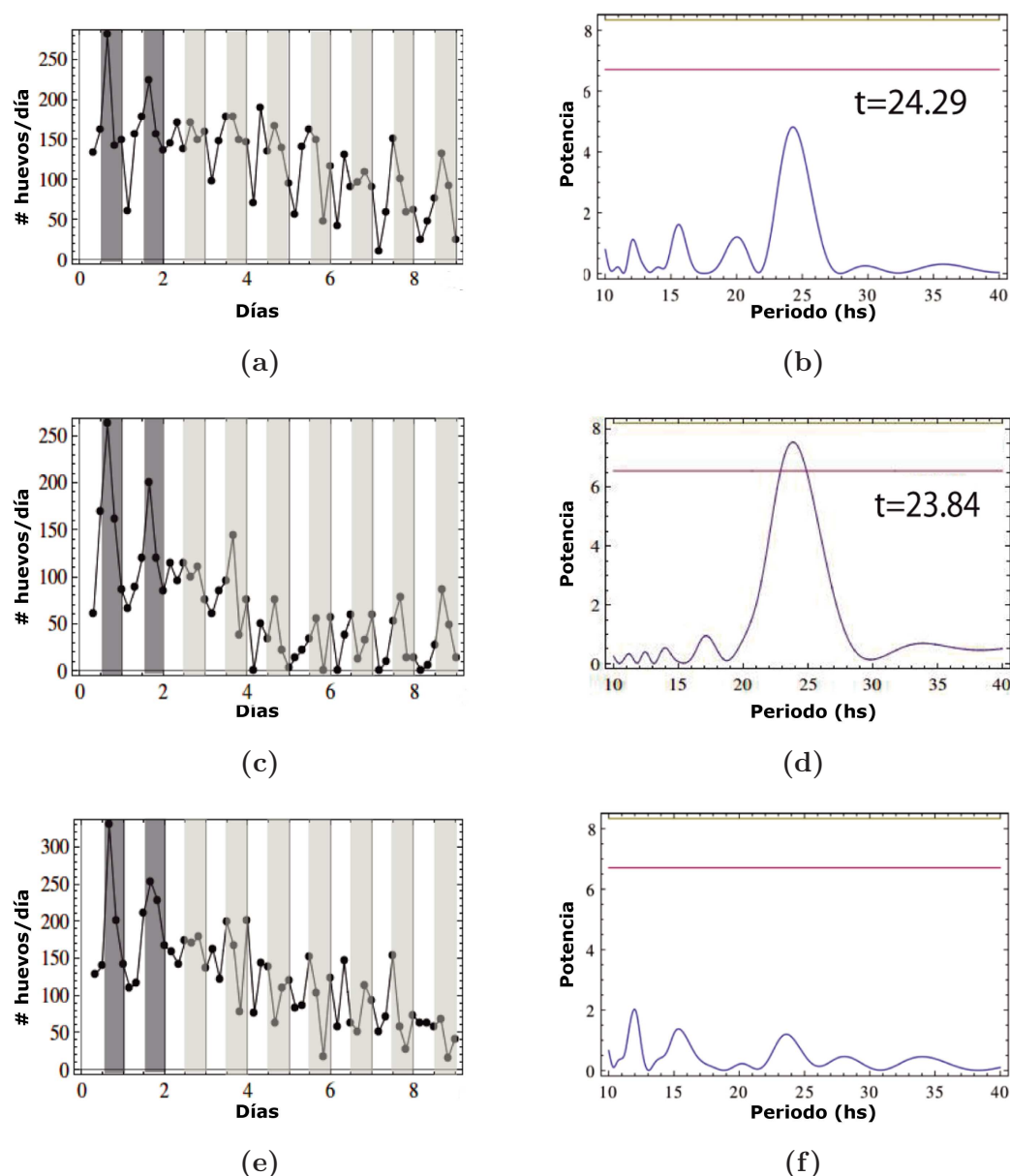


Figura 4.35: La disminución de *per* en el cerebro genera arritmicidad. Perfil representativo de la puesta de huevos y periodograma Lomb-Scargle para una mosca: (a-b) *elav/+* (c-d) *per^{RNAi}/+* y (e-f) *elav > per^{RNAi}*.

Durante los dos primeros días, con el ciclo de luz y oscuridad, las tres líneas de moscas se mantuvieron rítmicas manteniendo la mayor deposición de huevos entre las 17 y las 21 horas, como se observa en la Figura 4.35. Sin embargo, al pasarlas a DD, observamos que las moscas de la línea que no expresa *per* en el cerebro se vuelven todas arrítmicas, mientras que los controles mantienen la ritmicidad en porcentaje superior al 65% de los individuos (Tabla 4.4). De esta forma confirmamos la predicción de que la reducción panneuronal en los niveles de la proteína PER genera un fenotipo de arritmicidad. Por lo tanto deducimos en la jerarquía de los relojes, el reloj del cerebro

es el maestro y los relojes periféricos siguen su ritmicidad.

Genotipo	N	Período	% rítmicas
<i>elav/+</i>	15	24.29 ± 0.12	66.6 (10/12)
<i>per^{RNAi}/+</i>	10	24.46 ± 0.68	80 (8/10)
<i>elav > per^{RNAi}</i>	13	—	0 (0/13)

Tabla 4.4: Importancia de *per* en el cerebro. Se observa que más del 60 % de las moscas son rítmicas cuando expresan *per* en el cerebro, mientras que ninguna de las moscas *elav > per^{RNAi}* lo es. Los análisis corresponden a los 7 días en DD.

Tercer ensayo

Por último, quisimos evaluar cuáles de los grupos neuronales involucrados en la conformación del reloj maestro es el *pacemaker* para el comportamiento de oviposición. Para esto utilizamos una línea de *Drosophila* que no expresa *per* en las neuronas LNV, *pdfG4 > per^{RNAi}* y los controles correspondientes *pdf/+* y *per^{RNAi}/+*. Nuevamente mantuvimos las moscas en viales con una sola mosca durante dos días en LD y luego fueron cambiadas por siete días a condiciones de oscuridad constante. En este caso observamos que todas las moscas se mantienen rítmicas a pesar de la ausencia de *per* en este grupo neuronal, como se observa en la Figura 4.36. Con esto concluimos que las neuronas LNV no son responsables del correcto funcionamiento del ritmo de oviposición.

Genotipo	N	Período	% rítmicas
<i>pdfG4/+</i>	7	25.99 ± 0.5	71.4 (5/7)
<i>per^{RNAi}/+</i>	19	23.84 ± 0.27	52 (10/19)
<i>pdfG4 > per^{RNAi}</i>	16	23.84 ± 0.31	50 (8/16)

Tabla 4.5: Se detectan ritmos de oviposición en las moscas *pdfG4 > per^{RNAi}*.

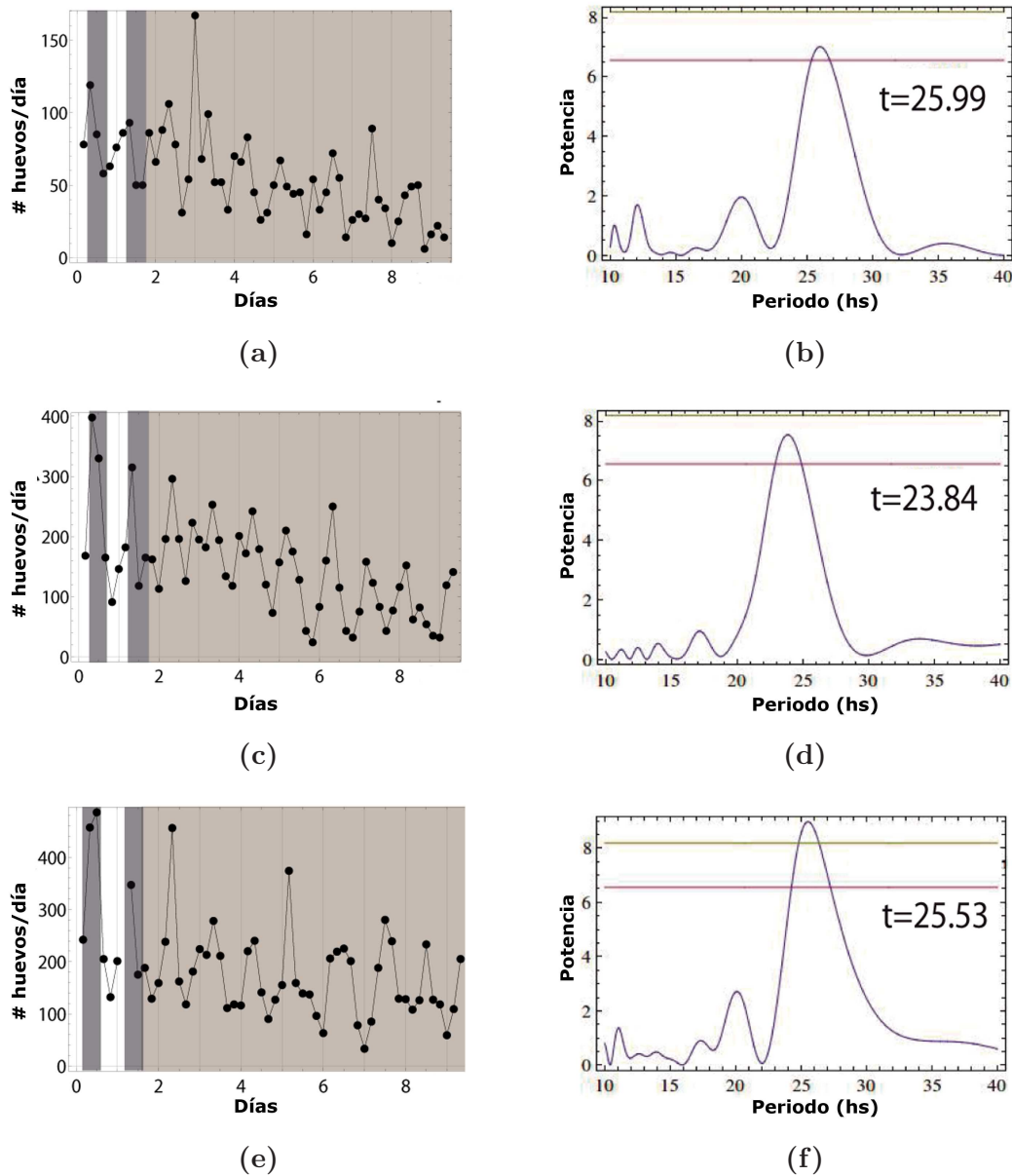


Figura 4.36: Las neuronas LNV no controlan la ritmicidad en la puesta de huevos. Perfil representativo de la puesta de huevos y periodograma Lomb-Scargle para una mosca hembra: (a-b) *pdfG4/+*, (c-d) *per^{RNAi}/+* y (e-f) *pdfG4 > per^{RNAi}*.

4.6.5. Proyectos

Actualmente se encuentra en proceso la construcción de un dispositivo para automatizar los experimentos de puesta de huevos, que se muestra en la Figura 4.37. En el mismo, cada mosca se encuentra sobre una pista de comida, y cada determinada ventana temporal va avanzando sobre la misma. En este momento se encuentra en fase de prueba, para encontrar posibles problemas como que la mosca se escape. Para esto se están realizando experimentos con hembras previamente apareadas de la línea Canton S (CS) en ciclos LD y luego en condiciones constantes de oscuridad (DD). Al igual que en los experimentos ya realizados en forma manual, esperamos obtener un pico de

deposición de huevos entre las 17-21 hs.



Figura 4.37: Ovipositor automático. Dispositivo automatizado para colocar las moscas en cápsulas que se desplazan automáticamente, de forma tal que los huevos pueden ser contados sólo una vez por día.

Los experimentos realizados en forma manual fueron el punto de partida para verificar la importancia del reloj en el proceso de oviposición. Sin embargo, debido a la demanda humana que requieren los experimentos para poder medir los huevos cada cuatro horas en forma individual, la cantidad de datos que tenemos es poca. La realización de este dispositivo es fundamental para poder estudiar grandes números de moscas y poder avanzar de forma más rápida. Los experimentos con el dispositivo para encontrar la jerarquía del circuito y el rol de las distintas neuronas podrían enmarcarse dentro de un nuevo proyecto de doctorado.

4.7. Conclusiones

La actividad locomotora es sin lugar a dudas el ritmo circadiano más estudiado en *Drosophila*. Los primeros experimentos estudiando este ritmo por Seymour Benzer tienen más de 50 años [117]. Sin embargo, debido a las limitaciones en los dispositivos de medición estándar, aún hay muchas propiedades de la actividad de las moscas desconocidas, como las propiedades estadísticas del comportamiento que surge de la interacción entre los osciladores del reloj central. Para poder estudiar ésto es necesario contar con alta resolución espacial y temporal en los datos, por lo que desarrollamos un nuevo dispositivo de monitoreo de actividad locomotora, el d-Tracker. A diferencia de los dispositivos usados usualmente, en el que se registra cuando la mosca cruza un haz de láser, en el d-Tracker registramos los datos por vídeo, lo que nos permite tener un gran detalle de las trayectorias de cada individuo. Así, logramos obtener nuevos resultados de un ritmo muy conocido.

En este capítulo analizamos los datos registrados con el dispositivo d-Tracker para moscas wild-type y mutantes para el gen *per*. Por un lado, encontramos que tanto las

distribuciones de los tiempos intereventos y de quietud como las distribuciones de las tasas de eventos son cualitativamente iguales a las del ratón cuando la mosca tiene el reloj normal. Pero aún más sorprendente que esto resulta que las funciones de scaling también son las mismas, así como el comportamiento de los factores de Allan y Fano, que dan cuenta sobre la fractalidad de los procesos. Esto nos sugiere que bajo estas distribuciones hay algún mecanismo del reloj compartido, o al menos algún proceso que da alguna ventaja adaptativa de forma que fue conservado evolutivamente entre insectos y mamíferos. Por otro lado, comprobamos que en el caso de las moscas cuyo reloj no funciona, los patrones de movimiento son distintos a los de las moscas normales.

Otro de los ritmos interesantes para ser estudiado en *Drosophila* es el comportamiento de oviposición. Si bien existen algunas evidencias de la ritmicidad en la puesta de huevos, los estudios realizados hasta el momento sobre este ritmo son mayormente a nivel poblacional, lo cual no permite saber con claridad si la puesta de huevos de cada mosca es rítmica o no. Durante el trabajo desarrollado en esta tesis realizamos experimentos midiendo la cantidad de huevos puestos por cada hembra contando los mismos cada cuatro horas durante nueve días. Esto requiere un gran esfuerzo a nivel de dedicación y recursos humanos, ya que cada mosca es manipulada manualmente, pero nos permite conocer con certeza que porcentaje de moscas es rítmica dentro de cada genotipo.

En primer lugar verificamos que las moscas wild-type presentan un ritmo circadiano en la oviposición. Luego, estudiamos líneas de moscas que carecen de alguno de los genes principales involucrados en la generación de oscilaciones circadianas. Encontramos que tanto las moscas *per*⁰¹ como las moscas *tim*⁰ son arrítmicas al poner huevos. Para identificar la jerarquía de los órganos periféricos como los ovarios en la puesta rítmica de huevos, realizamos experimentos con moscas que carecen de *per* en el cerebro. Los resultados de estos experimentos mostraron que la presencia de *per* en el cerebro es fundamental para que se mantenga el ciclo circadiano. Por último, con el objetivo de encontrar los circuitos neuronales que dominan la ritmicidad en el comportamiento de oviposición, analizamos la puesta de huevos en moscas que no expresan de *per* en las neuronas LNvs. Encontramos que la disminución de *per* en estas neuronas no afectó la ritmicidad de las moscas. A partir de los resultados obtenidos, se diseñó un ovipositor automático que nos permitirá realizar más experimentos con mayor cantidad de individuos, y de esta forma mejorar la estadística.

Capítulo 5

Conclusiones

El objetivo de esta tesis fue estudiar los ciclos circadianos en tres de los organismos modelos más importantes en cronobiología: las cianobacterias, los ratones y la mosca de la fruta. Para ello se utilizaron modelos matemáticos con ecuaciones diferenciales, simulaciones numéricas, se diseñó y construyó un dispositivo de monitoreo de actividad locomotora para las moscas, se realizaron experimentos y se hizo el análisis estadístico de los datos obtenidos.

En cianobacterias, estudiamos el valor adaptativo del reloj en el cambio de estaciones, es decir, modelamos cómo las fluctuaciones en la cantidad diaria de luz afectan la probabilidad de supervivencia cuando diferentes cepas de cianobacterias crecen en competencia. Utilizamos un modelo matemático que basa la interacción entre las cepas en un inhibidor difusible en el medio de cultivo.

Propusimos un protocolo experimental más simple que el usualmente utilizado, que suele incluir trasvasar las cepas a distintas cápsulas diluyéndolas, se puede probar la predicción del modelo. Con sólo ocho días de competencia y sin diluciones, se puede comprobar si la predicción del modelo sobre el porcentaje final de cada cepa de cianobacteria es correcta. De esta forma, haciendo uso de la modulación de la luz, se pueden acelerar los tiempos experimentales para estudiar la influencia del reloj y su valor adaptativo.

En mamíferos, estudiamos con un modelo matemático las propiedades de sincronización entre los dos grupos que forman el reloj central en el cerebro. Utilizando dos grupos de osciladores de fase totalmente acoplados, analizamos los efectos del cambio tanto en el acoplamiento interno de cada grupo como en el acoplamiento entre los dos grupos en la sincronización local y global por medio de simulaciones numéricas. Encontramos que incluso en este modelo sencillo pueden aparecer efectos antiintuitivos, ya que bajo determinadas condiciones aumentar el acoplamiento puede disminuir la sincronización global.

Además, incluso con un modelo que no toma en cuenta los mecanismos de oscilación

a nivel molecular de cada célula, pudimos reproducir resultados hallados experimentalmente, cómo la formación de pequeños grupos en distintas frecuencias cambiando los valores del acoplamiento y la relación antifase entre los dos grupos cambiando el retardo temporal. Nuestros resultados permitirían el desarrollo de un modelo más detallado que tengan en cuenta los detalles moleculares que permitan responder una pregunta aún abierta cómo cuáles son las características de interacción y acoplamiento entre las neuronas del núcleo supraquiasmático.

En *Drosophila*, estudiamos dos ritmos circadianos diferentes: uno estudiado desde hace muchísimos años, como la actividad locomotora, y uno del que se sabe muy poco, el ritmo de puesta de huevos en las hembras. Para poder estudiar el ritmo de actividad locomotora con una alta resolución espacial y temporal, diseñamos y fabricamos un dispositivo para hacer monitoreo de la actividad locomotora de las moscas por vídeo. Una vez construido el dispositivo al que llamamos d-Tracker, realizamos experimentos con moscas wild-type y mutantes para el gen *per*.

Encontramos que algunas de las propiedades estadísticas de la actividad de la mosca son muy similares a las del ratón, lo cual da idea de un mecanismo del reloj conservado entre insectos y mamíferos. El hecho de que las propiedades de scaling y de fractalidad sean tan similares entre la mosca y el ratón, junto con las similitudes entre ambos relojes a nivel molecular ya conocidas, nos permite inferir que algunas propiedades del reloj son conservadas evolutivamente. Además, encontramos similitudes y diferencias entre las propiedades estadísticas de las moscas wild-type y mutantes, lo cual nos permite distinguir entre mecanismos controlados o no por el reloj.

En el caso del ritmo de oviposición, lo estudiamos a nivel individual contando los huevos puestos por cada hembra cada cuatro horas durante nueve días. En primer lugar, verificamos que las moscas wild-type presentan un ritmo circadiano. Haciendo experimentos con mutantes, encontramos que la presencia de *per* en el cerebro es fundamental para que se mantenga el ciclo circadiano de oviposición, aunque la disminución de *per* en las neuronas LNVs no afecta la ritmicidad de las moscas, por lo que queda pendiente la búsqueda del circuito neuronal que domina el ritmo.

Los datos obtenidos en la segunda parte del trabajo son el resultado de la colaboración en el desarrollo del laboratorio de la Dra Lorena Franco. Los resultados de esta tesis permitieron el diseño de un dispositivo automático para los experimentos de oviposición y también el diseño de una incubadora que incorpora el dispositivo d-Tracker para la obtención de datos de actividad locomotora. Estos nuevos dispositivos permitirán considerar un aspecto interesante en el que se comenzó a trabajar, pero no forma parte de esta tesis, y que involucra el estudio del uso del espacio que hacen las moscas, un tema abierto y de actual interés para la comunidad de *Drosophila*.

Apéndice A

Dispositivo d-Tracker

El dispositivo para contener las pistas y registrar la actividad locomotora fue construido basándonos en el dispositivo propuesto por G. Gilestro [152]. El esquema del d-Tracker puede observarse en la Figura A.1.

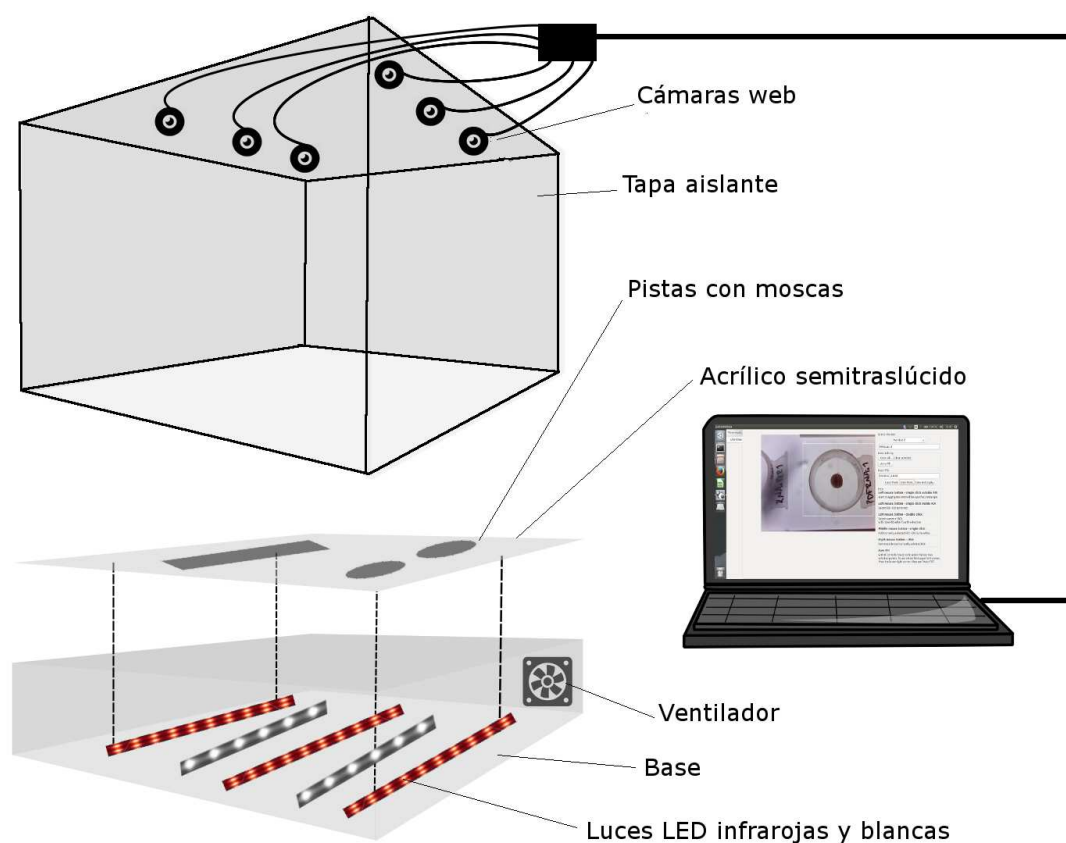


Figura A.1: Esquema del dispositivo de registro de actividad locomotora.

El d-Tracker consiste en una caja de fibrofacil que funciona como base y otra como tapa. Las medidas de la base son 30 por 30 por 12 centímetros de alto. En el fondo de la base se colocaron tiras de luces LED blancas y rojas. La intensidad de la lux fue

medida con un luxómetro y se obtuvo 2000 luz para las luces blancas y 200 para las rojas. A partir del experimento en el que se observó actividad nocturna en las moscas, se cambiaron las luces rojas por luces infrarrojas. Las luces blancas se conectan a la corriente junto con un timer digital, que regula los intervalos en los que son prendidas. Las luces infrarrojas se mantienen prendidas constantemente, para evitar fluctuaciones grandes de temperatura. Además, para ayudar a disipar el calor producido por las luces LED, se colocó un ventilador en uno de los costados de la base, el cual funciona durante todo el experimento.

La base se tapa con un acrílico semitráslucido, de forma tal que la iluminación de las tiras LED sea uniforme. Sobre el acrílico se colocan las pistas que contienen las moscas. Para evitar corrimientos de las pistas, se colocaron pasadores del mismo ancho que las pistas rectangulares, de forma tal que queden bien sujetas. En el caso de las cápsulas de Petri, se sujetaron con cinta adhesiva. Sobre el acrílico también se coloca un Thermochron, que es un datalogger o registrador de temperatura. El Thermochron almacena el resultado de las mediciones en su memoria interna. El almacenamiento es realizado en un intervalo de tiempo programable y definido por el usuario. De esta forma pudimos tener registro de las fluctuaciones en la temperatura dentro del dispositivo. Actualmente se cuenta con una incubadora que mantiene la temperatura constante en 25°.

La base junto con el acrílico y las pistas con moscas es aislado del exterior con una tapa de 30 por 30 por 30 centímetros. En la parte superior de la tapa se colocaron seis cámaras web con conexión USB, sin los filtros infrarrojos. Las cámaras son conectadas a una computadora, que tiene instalado el PySolo-Video. En las imágenes de la Figura A.2 se observan las imágenes del exterior del dispositivo en uno de los primeros experimentos utilizando el d-Tracker, mientras que en la Figura A.3 se observan las pistas ya acomodadas dentro del dispositivo. Una de las principales ventajas de este dispositivo es el bajo costo, la sencilla implementación y la gran cantidad de individuos que permite registrar.



Figura A.2: Vista exterior del d-Tracker. Fotos de una de las primeras implementaciones del d-Tracker en el laboratorio.

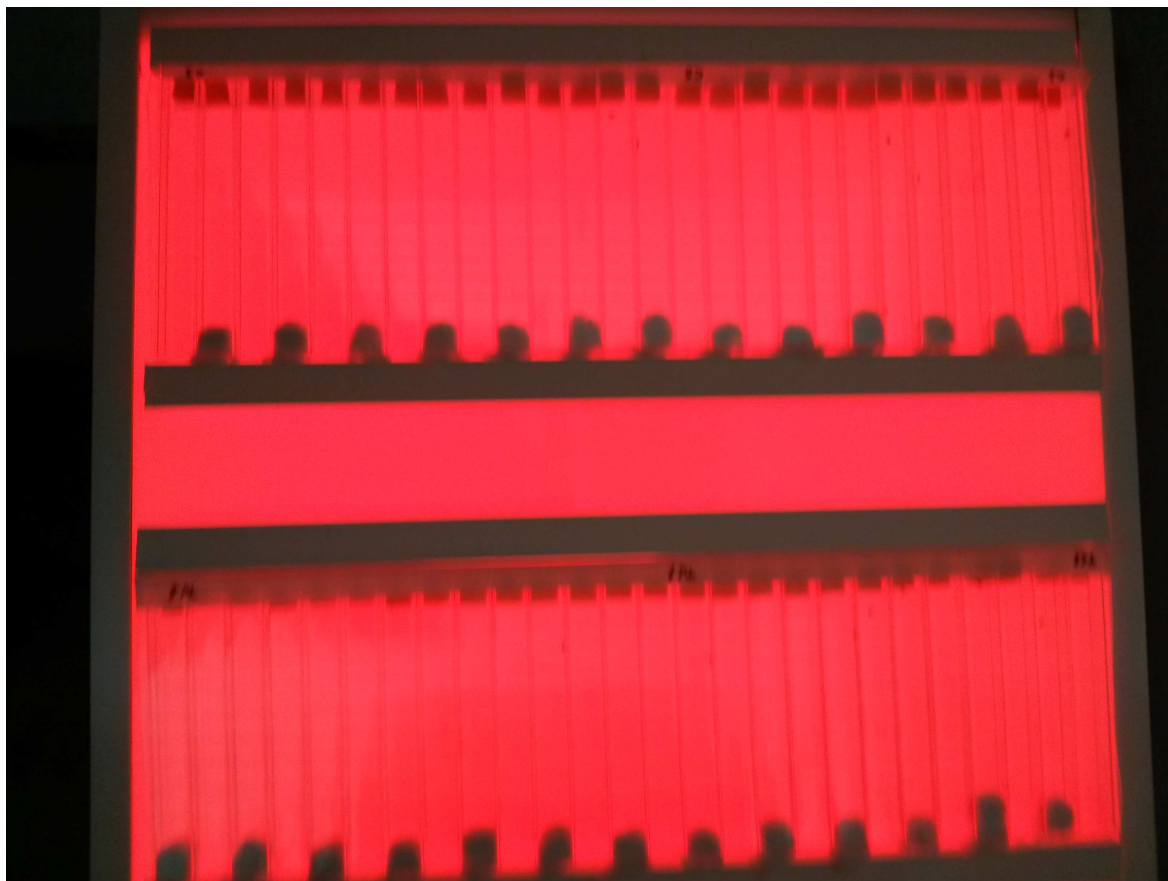


Figura A.3: Vista del interior del d-Tracker. Foto de las pistas acomodadas dentro de los pasadores, con las luces rojas encendidas.

Uno de los mayores problemas a la hora de hacer los experimentos fueron la temperatura y la humedad del cuarto de las moscas. En general, las moscas se encuentran en una incubadora como con la que se cuenta ahora, y las computadoras que hacen los registros están fuera de ella. Sin embargo, en nuestro caso, las computadoras se encontraban bajo las mismas condiciones ambientales que las moscas: 25° constantes y alta humedad, generada por un humidificador (usualmente un 80 %, medida con un higrómetro). Esto generaba que en varias oportunidades las computadoras se calienten y en consecuencia se reinicien. Para que el programa continúe registrando en ese caso, se utilizó un script escrito por el Dr. Sebastián Risau para relanzar el programa en caso que se detenga.

Otro de los problemas a la hora de hacer registros fueron los cortes de luz, hecho no poco habitual en Bariloche. Debido a esto se colocaron UPS para las luces, de forma tal que las moscas no pierdan el entrenamiento. Para las computadoras no se pudo hacer lo mismo ya que para alimentar dos notebooks se necesitan UPS más grandes y no se contaba con los recursos para adquirirlas.

Actualmente contamos con una incubadora lista para comenzar a hacer nuevos experimentos. Dentro de la incubadora, que se muestra en la Figura A.4, las condiciones

de humedad y temperatura están perfectamente controladas. Esto nos da la posibilidad de tener las computadoras fuera de la incubadora y de esa forma no exponerlas a condiciones desfavorables para su correcto funcionamiento.



Figura A.4: Dentro de la incubadora la temperatura se mantiene sin fluctuaciones. Esto permite tener las condiciones de humedad y temperatura controladas para las moscas, y tener las computadoras fuera de ese ambiente.

Bibliografía

- [1] Aschoff, J. Handbook of behavioural neurobiology. *Biological Rhythms. Plenum Press*, **4**, 1981. 2, 6
- [2] deMairan, J. Observation botanique. *Histoire de L'Academie Royale des Sciences*, pág. 35, 1729. 4
- [3] Mitsui, A., Kumazawa, S., Takahashi, A., Ikemoto, H., Cao, S., Arai, T. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, **323**, 720–722, 1986. 4, 23
- [4] Beling, I. Uber das zeitgedachtnis der bienen. *Z. Vgl. Physiol*, **9**, 259, 1929. 4
- [5] Kramer, G. Experiments on birds orientation. *Naturwissenschaften*, **94**, 265, 1952. 4
- [6] Richter, C. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.*, **1**, 1, 1922. 4
- [7] Simpson, S., Gaibraith, J. Observations on the normal temperature of the monkey and it diurnal variation, and on the effect of changes in the daily routine on this variation. *R. Soc. Edinb.*, **45**, 65, 1906. 4
- [8] Aschoff, J., Wever, R. Spontanperiodik des menschen bei ausschluss aller zeitgeber. *Naturwissenschaften*, **49**, 337, 1962. 5
- [9] Pittendrigh, C. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **25**, 169, 1960. 5, 17
- [10] Tresguerres, J. Fisiología humana. 4^a ed^{ón}. McGraw-Hill Medical, 2007. 6
- [11] Hedges, S. B. The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 2002. 6
- [12] Toh, K., Jones, C., He, Y., Eide, J., Hinz, W., Virshup, D., *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291**, 1040–1043, 2001. 7, 15, 39

- [13] Cohen, S., Golden, S. Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **79**, 373–385, 2005. 7
- [14] Grobbelaar, N., Huang, T., Li, H., Chow, T. Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **37**, 173–177, 1986. 7, 23
- [15] Huang, T., Chow, T. Characterization of the rhythmic nitrogen-fixing activity of *Synechococcus* RF-1 at the transcription level. *Curr. Microbiol.*, **20**, 23–26, 1990. 7
- [16] Read, N., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L., Smirnov, S., Purcell, S., *et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, **422**, 859, 2003. 7
- [17] Pittendrigh, C., Bruce, V., Rosensweig, N., Rubin, M. A biological clock in *Neurospora*. *Nature*, **184**, 169–170, 1959. 7
- [18] Dunlap, J., Loros, J. Analysis of circadian rhythms in *neurospora*: Overview of assays and genetic and molecular biological manipulation. *Methods Enzymol.*, **393**, 22, 2005. 7
- [19] Barak, S., Tobin, E., Green, R., Andronis, C., Sugano, S. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci*, **5**, 517–522, 2000. 8
- [20] Nakamichi, N. Molecular mechanisms underlying the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell Physiol*, **52**, 1709–1718, 2011. 8
- [21] Dubruille, R., Emery, P. A plastic clock: How circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Molecular Neurobiology*, **38**, 129–45, 2008. 9, 14
- [22] Panda, S., Hogenesch, J., Kay, S. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, **417**, 329–35, 2002. 9
- [23] Sheeba, V., Kaneko, M., Sharma, V., Holmes, T. The *Drosophila* circadian pace-maker circuit: Pas de Deux or Tarantella? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **43**(1), 37–61, 2008. 9
- [24] Meinertzhagen, I. Connectome studies on *Drosophila*: a short perspective on a tiny brain. *J Neurogenet.*, **30**, 62–8, 2016. 9
- [25] Ralph, M., Menaker, M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, **241**, 1225–7, 1988. 9

- [26] Ralph, M., Foster, R., Davis, F., Menaker, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, **247**, 975–8, 1990. 10, 36
- [27] Lowrey, P., Takahashi, J. Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. *Advances in genetics.*, **241**, 175–230, 2011. 10, 39
- [28] Vitaterna, M., King, D., Chang, A., Kornhauser, J., Lowrey, P., McDonald, J., *et al.* Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, **264**, 719–725, 1994. 10
- [29] Konopka, R., Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, **68**, 2112–6, 1971. 10, 64, 65, 66, 69
- [30] Dunlap, J. Molecular basis for circadian clocks. *Cell*, **96**, 1999. 10, 11
- [31] Ko, C., Takahashi, J. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, **15**, R271–R277, 2006. 11
- [32] Hardin, P., Yu, W. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *Journal of Cell Science*, **119**, 4793–95, 2006. 12
- [33] Qin, X., Byrne, M., Xu, Y., Mori, T., Johnson, C. Coupling of a core post-translational pacemaker to a slave transcription/translation feedback loop in a circadian system. *PLOS Biology*, **8**, e1000394, 2010. 12
- [34] Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C., Tanabe, A., *et al.* Expression of a gene cluster *kaiabc* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, **281** (5382), 1519–23, 1998. 12, 23
- [35] Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Y. Murayama, e. a. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science*, **308**, 414–415, 2005. 12
- [36] Ito, H., Kageyama, H., Nakajima, M., T. Oyama, e. a. Autonomous synchronization of the circadian KaiC phosphorylation rhythm. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1084–1088, 2007. 12
- [37] Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Terauchi, K., Kondo, T. Dual KaiC-based oscillations constitute the circadian system of cyanobacteria. *Genes and Development*, **22**, 1513–21, 2008. 12
- [38] Hertel, S., Brettschneider, C., Axmann, I. Revealing a two-loop transcriptional feedback mechanism in the cyanobacterial circadian clock. *PLOS Computational Biology*, **9**, e1002966, 2013. 13, 25

- [39] Rosato, E., Kyriacou, C. The role of natural selection in circadian behaviour: a molecular-genetic approach. *Essays in Biochemistry*, **49**, 71–85, 2011. 13, 14
- [40] Gallego, M., Virshup, D. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 139–148, 2007. 14, 15
- [41] Stoleru, D., Nawathean, P., Fernández, M., Menet, J., Ceriani, M., Rosbash, M. The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell*, **129**, 207–219, 2007. 14, 69
- [42] Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A., Young, M. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, **6**, 769–79, 2001. 14
- [43] Glossop, N., Lyons, L., Hardin, P. Interlocked feedbackloops within the *Drosophila* circadian pacemaker. *Science*, **286**, 766–768, 1999. 14
- [44] Hardin, P. Essential and expendable features of the circadian timekeeping mechanism. *Curr Opin Neurobiol*, **16**, 686–692, 2006. 14
- [45] Xu, Y., Padiath, O., Shapiro, R., Jones, C., Wu, S. Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, **434**, 640–44, 2005. 15
- [46] Mackey, S. Biological Rhythms Workshop IA: molecular basis of rhythms generation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, **7**, 7–19, 2007. 15
- [47] Golombek, D. Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad. Universidad Nacional de Quilmes, 2007. 18
- [48] Sokolove, P., Bushell, W. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol.*, **72** (1), 131–60, 1978. 18
- [49] Woelfle, M., Ouyang, Y., Phanvijhitsiri, K., Johnson, C. The adaptative value of circadian clocks: An experiment assesment in cyanobacteria. *Curr. Biology*, **14**, 1481–1486, 2004. 21, 23, 24, 25, 29, 32
- [50] Peleato, D. Las cianobacterias: cooperación vs. competencia. Real Academia de Ciencias Exactas, Fisicas, Quimicas y Naturales de Zaragoza, 2011. 21
- [51] Clark, D., Moore, R., Vodopich, D. Botany. McGraw-Hill Companies, Inc., 1998. 22
- [52] Herrero, A., Flores, E. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution. Caister Academic Press, 2008. 22

- [53] Stal, L., Krumbein, W. Nitrogenase activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. grown under alternating light-dark cycles. *Arch. Microbiol.*, **143**, 67–71, 1985. 23
- [54] Johnson, C., Mori, T., Xu, Y. A cyanobacterial circadian clockwork. *Current Biology*, **18**, 816–825, 2008. 23
- [55] Liu, Y., Tsinoremas, N., Johnson, C., Lebedeva, N., Golden, S., Ishiura, M., *et al.* Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.*, **9**, 1469–1478, 1995. 23
- [56] Johnson, C., Golden, S., Ishiura, M., Kondo, T. Circadian clocks in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, **21**, 5–11, 1996. 23
- [57] Vaze, K., Sharma, V. On the adaptive significance of circadian clocks for their owners. *Chronobiol. Int.*, **30**, 413–433, 2013. 23
- [58] Ouyang, Y., Andersson, C., Kondo, T., Golden, S., Johnson, C. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *PNAS*, **95**, 8660–8664, 1998. 25
- [59] Roussel, M., Gonze, D., Goldbeter, A. Modelling the differential fitness of cyanobacterial strains whose circadian oscillators have different free-running periods: Comparing the mutual inhibition and substrate depletion hypotheses. *J. Theor. Biol.*, **205**, 321–340, 2000. 25
- [60] Gonze, D., Roussel, M., Goldbeter, A. A model for the enhancement of fitness in cyanobacteria based on resonance of a circadian oscillator with the external light-dark cycle. *J. Theor. Biol.*, **214**, 577–597, 2002. 25, 26, 27, 37
- [61] Garner, W., Allard, H. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Monthly Weather Review*, 1920. 27
- [62] Hamner, K. Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. *Botanical Gazette*, **101**, 658–687, 1940. 28
- [63] <http://www.timeanddate.com/worldclock/sunrise.html>. 28
- [64] Dodd, A., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., *et al.* Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, **309**, 630–633, 2005. 33

- [65] Ma, P., Woelfle, M., Johnson, C. An evolutionary fitness enhancement conferred by the circadian system in cyanobacteria. *Chaos, Solitons & Fractals*, **50**, 65–74, 2013. 33
- [66] Nguyen, D., Xu, T. The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. *Dis Model Mech.*, **1**, 56–66, 2008. 35
- [67] Paigen, K. One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. the classical period (1902– 1980). *Genetics*, **163**, 1–7, 2003. 35
- [68] Peters, L., Robledo, R., Bult, C., Churchill, G., Paigen, B., Svenson, K. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 58–69, 2007. 35
- [69] Pierce, B. Genética: un enfoque conceptual. Ed. Médica Panamericana, 2009. 36
- [70] Moore, R., Eichler, B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42**, 201–6, 1972. 36
- [71] Sujino, M., Masumoto, K., Yamaguchi, S., van der Horst, G., Okamura, H., Inouye, S. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.*, **13**, 664–8, 2003. 36
- [72] Herzog, E., Aton, S., Numano, R., Sakaki, Y., Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms.*, **19**, 35–46, 2004. 37
- [73] Liu, C., Weaver, D., Strogatz, S., Reppert, S. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*, **91**, 855–860, 1997. 37
- [74] Evans, J., Leise, T., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A. Intrinsic regulation of spatiotemporal organization within the suprachiasmatic nucleus. *PLoS One*, 2011. 37
- [75] Foley, N., Tong, T., Foley, D., Lesauter, J., Welsh, D., Silver, R. Characterization of orderly spatiotemporal patterns of clock gene activation in mammalian suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 2011. 37
- [76] Welsh, D., Takahashi, J., Kay, S. Suprachiasmatic Nucleus: Cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 551–77, 2010. 37
- [77] Lincoln, G. Melatonin entrainment of circannual rhythms. *Chronobiol Int.*, **23** (1), 301–6, 2006. 38

- [78] Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., Takumi, T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*, **5:18**, 2004. 38
- [79] Yoshino, J., Klein, S. A novel link between circadian clocks and adipose tissue energy metabolism. *Diabetes*, **62** (7), 2175–2177, 2013. 38
- [80] Yoo, S., Yamazaki, S., Lowrey, P., Shimomura, K., Ko, C. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *PNAS*, **101**, 5339–5346, 2004. 38
- [81] Schibler, U., Ripperger, J., Brown, S. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, **18**, 250–60, 2003. 38
- [82] Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Ishida, T. N. N. Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **253**, 199–203, 1998. 38
- [83] Chung, S., Son, G., Kim, K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochimica et Biophysica*, **1812**, 581–591, 2011. 39
- [84] Hirota, T., Fukada, Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci*, **21**, 359–368, 2004. 39
- [85] Takahashi, J., Hong, H., Ko, C., McDeamon, E. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*, **9**, 764–775, 2008. 39
- [86] Myung, J., Hong, S., Hatanaka, F., Nakajim, Y., DeSchutter, E., Takumi, T. Period coding of Bmal1 oscillators in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, **32**, 8900–8918, 2008. 39
- [87] Pikovsky, A., Rosenblum, M., Kurths, J. Synchronization. A universal concept in nonlinear sciences. Cambridge University Press, 2001. 43, 45, 51
- [88] Pecora, L., Carrol, T. Synchronization in chaotic systems. *Physical Review Letters*, **64** (821), 1990. 44
- [89] Kuramoto, Y. Chemical Oscillations, Waves and Turbulence. Springer, 1984. 45, 51

- [90] Winfree, T. The Geometry of Biological Time. Interdisciplinary Applied Mathematics. Springer, 2001.
- [91] Strogatz, S. Sync. The Emerging Science of Spontaneous Order. Hyperion, 2003. 51
- [92] Manrubia, S., Mikhailov, A., Zanette, D. Emergence of Dynamical Order. Synchronization Phenomena in Complex Systems. World Scientific, 2004. 52
- [93] Acebrón, J., Bonilla, L., Pérez Vicente, C., Ritort, F., Spigler, R. The Kuramoto model: A simple paradigm for synchronization phenomena. *Rev. Mod. Phys.*, **77**, 137, 2005. 45, 51
- [94] Kiss, I., Quigg, M., Chun, S., Kori, H., Hudson, J. Characterization of synchronization in interacting groups of oscillators: Application to seizures. *Biophysical Journal*, **94**, 1121–1130, 2008. 48, 49, 51, 52
- [95] Mikhailov, A., Zanette, D., Zhai, Y., Kiss, I., Hudson, J. Cooperative action of coherent groups in broadly heterogeneous populations of interacting chemical oscillators. *PNAS*, **101**, 10890–10894, 2004. 48, 52
- [96] Daan, S., Pittendrigh, C. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of comparative physiology*, **106**, 253, 1976. 49
- [97] Helfrich-Förster, C. Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice? *J. Biol. Rhythms*, **24**, 259–270, 2009. 49
- [98] Hoffman, K., Illnerová, H., Vanecek, J. Effect of photoperiod and of one minute light at night-time on the pineal rhythm on N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Biol Reprod*, **24**, 551–556, 1981. 49
- [99] Yan, L., Foley, N., Bobula, J., Kriegsfeld, L., Silver, R. Two antiphase oscillations occur in each suprachiasmatic nucleus of behaviorally split hamsters. *J. Neurosci*, **25**, 9017–26, 2005. 49
- [100] Quintero, J., Kuhlman, S., McMahon, D. The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J. Neurosci.*, **22**, 8070, 2003. 49, 61
- [101] Okuda, K., Kuramoto, Y. Mutual entrainment between populations of coupled oscillators. *Prog. Theor. Phys.*, **86**, 1159–1176, 1991. 49
- [102] Montbrió, E., Kurths, J., Blasius, B. Synchronization of two interacting populations of oscillators. *Phys. Rev. E*, **70**, 056125–1:4, 2004. 49

-
- [103] Sheeba, J., Chandrasekar, V., Stefanovska, A., McClintock, P. Routes to synchrony between asymmetrically interacting oscillator ensembles. *Phys. Rev. E*, **78**, 025201, 2008. 49
- [104] Barreto, E., Hunt, B., Ott, E., So, P. Synchronization in networks of networks: The onset of coherent collective behavior in systems of interacting populations of heterogeneous oscillators. *Phys. Rev. E*, **77**, 036107, 2008. 49
- [105] Abrams, D., Mirollo, R., Strogatz, S., Wiley, D. Solvable model for chimera states of coupled oscillators. *Phys. Rev. Lett.*, **101**, 084103, 2008. 49
- [106] Martens, E., Barreto, E., Strogatz, S., Ott, E., So, P., Antonsen, T. Exact results for the Kuramoto model with a bimodal frequency distribution. *Physical Review E*, **79**, 026204, 2009. 49, 51
- [107] Kiss, I., Zhai, Y., Hudson, J. Emerging coherence in a population of chemical oscillators. *Science*, **296**, 1676–1678, 2002. 51, 52
- [108] Ott, E., Antonsen, T. Low dimensional behavior of large systems of globally coupled oscillators. *Chaos*, **18**, 037113, 2008. 51
- [109] Sakaguchi, H. Cooperative phenomena in coupled oscillator systems under external fields. *Prog. Theor. Phys.*, **79**, 39, 1988. 52
- [110] Engelbrecht, J., Mirollo, R. Structure of long-term average frequencies for Kuramoto oscillator systems. *Phys. Rev. Lett.*, **109**, 2012.
- [111] Pazo, D., Montbrió, E. Low-dimensional dynamics of populations of pulse-coupled oscillators. *Phys. Rev. X*, **4**, 2014. 52
- [112] Abraham, U., Granada, A., Westermarck, P., Heine, M., Kramer, A., Herzel, H. Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Molecular Systems Biology*, **6**, 438, 2010. 52
- [113] Buzna, L., Lozano, S., Díaz-Guilera, A. Synchronization in symmetric bipolar population networks. *Phys. Rev. E*, **80**, 066120, 2009. 54
- [114] Schaap, J., Albus, H., van der Leest, H., Eilers, P., Détári, L., Meijer, J. Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *PNAS*, **100(26)**, 15994–15999, 2003. 56
- [115] de la Iglesia, H., Meyer, J., Carpino Jr, A., Schwartz, W. Antiphase oscillation of the left and right Suprachiasmatic Nuclei. *Science*, **290**, 2000. 57, 61

- [116] Li, D., Zhou, C. Organization of anti-phase synchronization pattern in neural networks: what are the key factors? *Frontiers in Systems Neuroscience*, **5**, 2011. 57
- [117] Weiner, J. Time, Love, Memory: A Great Biologist and His Quest for the Origins of Behavior. Vintage Books, 1998. 64, 103
- [118] Vosshall, L. Into the mind of a fly. *Nature*, **450**, 193–97, 2007. 65
- [119] Hao, H., Allen, D., Hardin, P. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.*, **17** (7), 3687–3693, 1997. 65
- [120] Konopka, R., Hamblen-Coyle, M., Jamison, C., Hall, J. An ultrashort clock mutation at the period locus of *drosophila melanogaster* that reveals some new features of the fly's circadian system. *J Biol Rhythms.*, **9** (3), 189–216, 1994. 66
- [121] Hamblen, M., White, N., Emery, P., Kaiser, K., Hall, J. Molecular and behavioral analysis of four period mutants in *Drosophila melanogaster* encompassing extreme short, novel long, and unorthodox arrhythmic types. *Genetics*, **149** (1), 165–178, 1998. 66
- [122] Sehgal, A., Price, J., Man, B., Young, M. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, **263**, 1603–1606, 1994. 66
- [123] Wülbeck, C., Szabo, G., Shafer, O., Helfrich-Förster, C., Stanewsky, R. The novel *Drosophila* timblind mutation affects behavioral rhythms but not periodic eclosion. *Genetics*, **169** (2), 751 – 766, 2005. 66
- [124] Allada, R., White, N., So, W., Hall, J., Rosbash., M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, **93** (5), 791 – 804, 1998. 66
- [125] Rutila, J., Suri, V., Le, M., So, W., Rosbash, M., Hall, J. {CYCLE} is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, **93** (5), 805 – 814, 1998. 66
- [126] Yoshii, T., Wülbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., *et al.* The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *J Neurosci.*, **29** (8), 2597–610, 2009. 66
- [127] Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., Rosbash, M. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature*, **431**, 862–868, 2004. 66

- [128] Bao, S., Rihel, J., Bjes, E., Fan, J., Price, J. The *Drosophila* double-timeS mutation delays the nuclear accumulation of period protein and affects the feedback regulation of period mRNA. *J Neurosci.*, **21** (18), 7117–26, 2001. 66
- [129] R.Stanewsky, Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S., *et al.* The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *drosophila*. *Cell*, **95** (5), 681–92, 1998. 66, 68
- [130] Allada, R., Chung, B. Circadian organization of behavior and physiology in *drosophila*. *Annual review of physiology*, **72** (7), 605–624, 2010. 67, 68
- [131] Kadener, S., Menet, J., Schoer, R., Rosbash, M. Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLoS Biol*, **6**, e119, 2008. 67
- [132] Helfrich-Förster, C. The circadian system of *drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology*, **105**, 297–312, 2002. 68
- [133] Emery, P., So, W., Kaneko, M., Hall, J., Rosbash, M. PCRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, **95**, 669–679, 1998. 68
- [134] Ceriani, M., Darlington, T., Staknis, D., Más, P., Petti, A., Weitz, C., *et al.* Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, **285**, 553–6, 1999. 68
- [135] Busza, A., Emery-Le, M., Rosbash, M., Emery, P. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science*, **304**, 1503–6, 2004. 68
- [136] Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M., Saez, L. Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron*, **30**, 699–706, 2001. 68
- [137] Kaneko, M. Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 652–658, 1998. 68
- [138] Kaneko, M., Hall, J. Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J. Comp. Neurol.*, **422** (1), 66–94, 2000. 68
- [139] Grima, B., Chelot, E., Xia, R., Rouyer, F. Morning and evening activity peaks are controlled by different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, **431**, 869–873, 2004. 69

- [140] Helfrich-Förster, C., Shafer, O., Wülbec, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Taghert, P. Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, **500** (1), 47–70, 2007. 69
- [141] Sheeba, V. The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. *J. Genet.*, **87**, 385–93, 2008. 69
- [142] Helfrich-Förster, C. The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, **92** (2), 612–616, 1995. 69
- [143] Peng, Y., Stoleru, D., Levine, J., Hall, J., Rosbash, M. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol.*, **1**, E13, 2003. 69
- [144] Lin, Y., Stormo, G., Taghert, P. The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinate pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J. Neurosci.*, **24** (2), 7951–57, 2004.
- [145] Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., Rosbash, M. A resetting signal between *drosophila* pacemakers synchronizes mornign and evenign activity. *Nature*, **439**, 238–242, 2005. 69
- [146] Krishnan, B., Dryer, S., Hardin, P. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **400**, 375–78, 1999. 69
- [147] Lee, J., Emery, I. Circadian regulation in the ability of *Drosophila* to combat pathogenic infections. *Curr Biol*, **18**, 195–99, 2008. 69
- [148] Sakai, T., Ishida, N. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *PNAS*, **98**, 9221–25, 2001. 69
- [149] Lyons, L., Roman, G. Circadian modulation of short-term memory in *drosophila*. *Learn Mem*, **16**, 19–27, 2009. 69
- [150] Pfeiffenberger, C., Lear, B., Keegan, K., Allada, R. Locomotor activity level monitoring using the *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harb Protoc.*, **11**, 2010. 70
- [151] Bachleitner, W., Kempinger, L., Wülbeck, C., Rieger, D., Helfrich-Förster, C. Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, **104** (9), 3538–3543, 2007. 71

-
- [152] Gilestro, G. Video tracking and analysis of sleep in *Drosophila melanogaster*. *Nature Prot*, **7** (5), 995–1007, 2012. 72, 107
- [153] Seiger, M., Kink, J. The effect of anesthesia on the photoresponses of four sympatric species of *Drosophila*. *Behav Genet*, **23** (1), 99–104, 1993. 75
- [154] Wolf, M., Rockman, H. *Drosophila*, genetic screens, and cardiac function. *Circulation Research*, **109**, 794–806, 2011. 75, 76
- [155] Proekt, A., Banavar, J., Maritan, A., Pfaff, D. Scale invariance in the dynamics of spontaneous behavior. *PNAS*, **109** (26), 10564–10569, 2012. 79, 80, 86
- [156] Lo, C., Chou, T., Penzel, T., Scammell, T., Strecker, R., Stanley, E., *et al.* Common scale-invariant patterns of sleep–wake transitions across mammalian species. *PNAS*, **101**, 17545–17548, 2004. 82, 85
- [157] Anteneodo, C., Chialvo, D. Unraveling the fluctuations of animal motor activity. *Chaos*, **19**, 33123, 2009. 88, 91
- [158] Allemand, R. Influence of light condition modification on the circadian rhythm of vitellogenesis and ovulation in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, **22**, 1075–1080, 1976. 95
- [159] Howlader, G., Sharma, V. Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, **52**, 779–785, 2006. 95
- [160] Manjunatha, T., Dass, S., Sharma, V. Egg-laying rhythm in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Genetics*, **87** (5), 495–504, 2008. 95

Publicaciones asociadas

1. What season suits you best? Seasonal light changes and cyanobacterial competition

G. Cascallares y P. M. Gleiser . Papers in Physics, doi: <http://dx.doi.org/10.4279/PIP.070005> (2015)

2. Clustering and phase synchronization in populations of coupled phase oscillators

G. Cascallares y P. M. Gleiser, Eur. Phys J. B, vol 88, (2015)

Agradecimientos

A lo largo de estos últimos cinco años mi vida cambió en todos los aspectos. Me mudé a Bariloche, teniendo por primera vez la experiencia de vivir sola, con una amiga y en pareja. Viajé, me casé, tuve una hija. Pasé de la oficina al laboratorio, y me di cuenta que me gusta más lo segundo. La pasé bien, mal y más o menos, pero de todo algo aprendí y siempre hubo alguien que me dió una mano para seguir. Por eso quiero agradecer a todos los que de una manera u otra forman parte de esta tesis.

Siguiendo un orden caprichoso, voy a comenzar con quienes vivieron más de cerca este trabajo y con quienes compartí el día a día (y un par de noches):

A Pablo, por ser el mejor director de tesis de doctorado que tuve. Por transmitirme su entusiasmo y hacer de esta tesis una montaña rusa de ideas y proyectos diferentes. De cada uno aprendí algo. Por haberme escuchado cuando lo necesité e ignorado cuando era necesario, aunque lo haya detestado. Gracias Pablo, te volvería a elegir.

A Lore y Seba, por las horas compartidas en el laboratorio y todo lo que aprendí de las moscas.

A todos los de Fiestin. A los que pasaron por la “oficina 1”, en especial a Saltita, Andy, Rodo, Alex e Isaias, por los mates, charlas y el frío compartido. A las chicas, por los almuerzos, té y otros encuentros. En especial a Caro por ser la primera en acercarse, y a María y Lai por las largas charlas y juntadas a pesar de ser una misión más difícil que el doctorado coordinarlas. A Damián, por los asados para cortar o despedir la semana (siempre que el clima acompañe). A las tortas de los cumpleaños. Al técnico que la pifió en la primer semana que estuve acá y me prendió fuego el monitor. A los asados de Mato.

A Meli, porque como dijo alguna vez, nunca es tarde para conocer a un gran amigo. Por las infinitas cosas compartidas y tortas hechas. Por soportarme (y a mi por soportarte).

A CONICET por la beca y a la DAAD por darme la oportunidad de viajar a Alemania. Al Dr Hanspeter Herzog por recibirme en Berlin y a Christoph Schmal por trabajar conmigo.

A Rodri, por bancarme en todas. Por siempre estar ahí para convencerme de que puedo todo lo que quiera y creer en mí. Por hacerme reír.

A Cata, por cambiar mi realidad y mis prioridades. Por levantarse todos los días

con una sonrisa. Por soportar estos meses y los nervios que vinieron con ellos.

A mi mamá, por haber forjado gran parte de quien soy hoy. Por haberme apoyado siempre.

A mis hermanos, porque forman parte de mis recuerdos más lindos.

Y a varios más que formaron parte de este camino, que por suerte no fueron pocos.
Gracias totales.